

MEDEDELINGEN LANDBOUWHOGESCHOOL  
WAGENINGEN • NEDERLAND • 68-5 (1968)

RECHERCHES SUR LA MALADIE,  
DUE A *METARRHIZIUM ANISOPLIAE*  
CHEZ LE CRIQUET PÈLERIN

*(with an English summary)*

K. H. VEEN

*Laboratoire d'Entomologie, Communication 150, et  
Laboratoire de Phytopathologie, Communication 234,  
Université Agronomique,  
Wageningen, Pays-Bas*

(Reçu 4-1-1968)

H. VEENMAN & ZONEN N.V. - WAGENINGEN - 1968

2000016

Mededelingen Landbouwhogeschool  
Wageningen 68-5 (1968)  
(Communications de l'Université Agronomique)  
a été publiée également comme thèse

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1. INTRODUCTION . . . . .</b>	<b>1</b>
1.1. Chaîne d'infection . . . . .	1
1.2. Pathogénèse . . . . .	2
1.3. Reproduction du pathogène . . . . .	4
<b>2. NOMENCLATURE DU CHAMPIGNON . . . . .</b>	<b>6</b>
2.1. Histoire . . . . .	6
2.2. Formae . . . . .	9
2.3. La forme parfaite . . . . .	10
<b>3. ISOLEMENT, DÉVELOPPEMENT ET CROISSANCE IN VITRO, CONSERVATION . . . . .</b>	<b>12</b>
3.1. Isolement . . . . .	12
3.2. Développement et croissance . . . . .	13
3.2.1. Culture en petites quantités . . . . .	13
3.2.2. Culture flottante . . . . .	14
3.2.3. Culture en masse . . . . .	14
3.2.3.1. Blastospores . . . . .	14
3.2.3.2. Conidiospores . . . . .	15
3.2.4. Développement et croissance: données complémentaires . . . . .	16
3.2.4.1. Influence de la température . . . . .	16
3.2.4.2. Influence du pH . . . . .	16
3.2.4.3. Influence de la lumière . . . . .	16
3.2.4.4. Influence de l'humidité relative . . . . .	17
3.2.4.5. Valeur nutritive de différents constituants chimiques . . . . .	17
3.3. Conservation . . . . .	18
3.3.1. Conservation au réfrigérateur . . . . .	18
3.3.2. Lyophilisation . . . . .	18
<b>4. LISTE D'HÔTES . . . . .</b>	<b>19</b>
<b>5. GERMINATION ET DÉVELOPPEMENT DES TUBES GERMINATIFS . . . . .</b>	<b>25</b>
5.1. Morphologie des conidies et leur pouvoir germinatif . . . . .	25
5.1.1. Morphologie des conidies . . . . .	25
5.1.2. Conservation du pouvoir germinatif . . . . .	26
5.1.3. Evaluation du pouvoir germinatif . . . . .	26
5.2. Conditions extrinsèques et intrinsèques influençant la germination . . . . .	27
5.2.1. Conditions extrinsèques . . . . .	27
5.2.1.1. Influence de l'humidité relative in vitro et in vivo . . . . .	27
5.2.1.2. Influence de la surface . . . . .	30
5.2.2. Conditions intrinsèques . . . . .	31
5.3. Déroulement de la germination jusqu'au début de la pénétration . . . . .	33
<b>6. PÉNÉTRATION ET INFECTION . . . . .</b>	<b>36</b>
6.1. Données bibliographiques . . . . .	36
6.2. Techniques histologiques . . . . .	37
6.2.1. Colorations . . . . .	37
6.3. Passage des conidiospores par le tube digestif . . . . .	38
6.4. Infection orale . . . . .	38
6.5. Infection par le tégument . . . . .	39
6.6. Infection rectale . . . . .	41
6.7. Essais d'infection par les stigmates . . . . .	42

7. DERNIÈRE PHASE DE LA MALADIE . . . . .	43
7.1. L'invasion . . . . .	43
7.2. Symptômes externes pendant l'invasion . . . . .	43
7.3. Mort de l'insecte . . . . .	43
8. SPORULATION . . . . .	46
8.1. Généralités . . . . .	46
8.2. Pouvoir de sporulation après la mort . . . . .	46
8.3. Différences entre les souches . . . . .	47
9. ESSAIS DE DOSAGE . . . . .	50
9.1. Données bibliographiques . . . . .	50
9.2. L'élevage des criquets . . . . .	51
9.3. Technique et résultats des dosages . . . . .	51
9.3.1. Production de l'inoculum . . . . .	51
9.3.2. Essais avec des larves du premier stade . . . . .	52
9.3.3. Essais avec des larves du deuxième stade . . . . .	52
9.3.3.1. Comparaison de différentes souches . . . . .	56
9.3.3.2. Influence du poids . . . . .	57
9.3.3.3. Pulvérisation aqueuse sur la nourriture . . . . .	58
9.3.3.4. Essais d'infection avec des blastospores . . . . .	58
9.3.4. Essais avec des larves du troisième stade, pulvérisation aqueuse sur la nourriture . . . . .	59
10. RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS . . . . .	60
11. SAMENVATTING EN KONKLUSIES . . . . .	64
12. SUMMARY AND CONCLUSIONS . . . . .	68
13. BIBLIOGRAPHIE . . . . .	72

## 1. INTRODUCTION

L'origine des études sur les maladies cryptogamiques des insectes coïncide pratiquement avec les travaux d'AGOSTINO BASSI (1773–1856). Travaillant sur le Ver à soie il démontra que la maladie connue à cette époque sous le nom de 'calcinaccio' ou 'moscardino' était due à un organisme cryptogamique. Dans son livre remarquable 'Del Mal Del Segno' (1835) il met en évidence que cette maladie est causée par un champignon qui se développe dans le Ver à soie et le tue. Les vers tués de cette façon peuvent à leur tour contaminer d'autres individus.

PASTEUR, (1874) ayant émis l'idée qu'on pourrait éventuellement utiliser les champignons entomopathogènes comme moyen de lutte contre les insectes, l'étiologie des maladies cryptogamiques commença à se développer rapidement grâce aux travaux de ELIE METCHNIKOFF (1845–1916). Il donna le stimulus à un grand nombre de chercheurs à la fin du siècle dernier pour faire des recherches plus approfondies dans ce domaine scientifique encore inconnu en grande partie.

Actuellement ce domaine des mycoses d'insectes s'est considérablement élargi. Une revue bibliographique générale montre qu'il est fort difficile de dégager des lois générales sur l'étiologie des champignons entomopathogènes. Tout d'abord en raison de ce que la distinction entre 'pathogène', 'parasite' et 'symbiote' est souvent difficile à déterminer. Egalement parce que les caractéristiques des espèces entomopathogènes des différentes classes: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* et *Deuteromycetes* diffèrent en effet trop considérablement. Avec quelques réserves on peut oser généraliser dans le cas des *Deuteromycetes*. En principe l'étiologie en ce cas peut être divisée en trois parties successives : la chaîne d'infection, la pathogénèse et la reproduction du pathogène.

### 1.1. CHAÎNE D'INFECTION

Il faut d'abord constater que la chaîne d'infection peut être différente pour un insecte vivant dans le sol et un insecte aérien.

En fait nous ne savons pas très bien si l'infection dans le sol se réalise fréquemment par un mycélium provenant directement d'un hôte mycosé ou par l'intermédiaire d'une spore donnant naissance à un tube germinatif. Il est évident, surtout dans le cas de populations d'insectes denses que la chaîne d'infection est directe c.a.d. que la maladie se transmet directement d'insecte mycosé à insecte vivant. Etant donné que dans l'intérieur d'un insecte mycosé, un pseudosclérote peut se former et donner naissance à des conidies quand les conditions climatiques deviennent favorables, l'intervalle de temps entre la mort d'un insecte et la contamination d'un autre insecte par le cadavre du premier peut être considérable. Quant aux stades saprophytiques des champignons entomopathogènes, les rares observations ne permettent pas de généraliser. Constatons que le phénomène général de fongistatisme dans le sol influence

probablement aussi bien la vie saprophyte des champignons entomopathogènes que celle (plus connue) des autres champignons.

Pour les spores, le sol paraît être un réservoir relativement favorable, surtout quand l'organisme en question a la capacité de produire des organes de résistance (chlamydospores par exemple).

Les insectes aériens peuvent se contaminer directement par le mycélium provenant d'un hôte mycosé (FAWCETT, 1910) mais cette voie, quoique observée, paraît loin d'être la voie la plus fréquente. Un mycélium aérien, exposé aux conditions climatiques extrêmes (sécheresse, rayons ultraviolets) a peu de chance de survivre. Ces conditions climatiques influencent d'ailleurs certainement d'une façon importante le pouvoir germinatif des conidies, organes réalisant l'infection dans la plupart des cas. Le contact direct d'un insecte avec un mycélium sporulant sur un cadavre peut se produire. Mais le contact indirect, c.a.d. l'infection avec des spores transportées par le vent, la pluie ou même d'autres insectes et des acariens doit être considéré également. De rares observations (VAGO, 1958) démontrent qu'un champignon ordinairement phytopathogène peut contaminer également un insecte. La voie d'infection la plus courante semble être le contact direct entre un insect sain et un cadavre mycosé de la même ou d'une autre espèce. Ici s'impose évidemment déjà la question de la spécificité, problème sur laquelle nous revenons en traitant la pathogénèse.

## 1.2. PATHOGÉNÈSE

Essayons de généraliser les phénomènes qui se produisent quand l'infection d'un insecte par un champignon entomopathogène de la classe des Deuteromycètes se réalise.

En fait on ne sait pas très bien quelle voie le pathogène peut prendre ou prend dans la majorité des cas: par le tégument, par le tube digestif, par la bouche ou par les stigmates. Il y a un certain nombre de facteurs qui doivent être favorables pour que la germination ait lieu comme la température, l'humidité relative, la pH et peut-être la lumière. Remarquons que ces facteurs physiques décident éventuellement aussi la capacité des spores d'adhérer à un endroit convenable pour la pénétration. Lorsque une spore a germé il paraît probable que, quand les facteurs physiques qui influencent la germination sont optimum ils seront également optimum pour la pénétration. Les capacités enzymatiques du champignon de réaliser la lyse du tégument interviennent alors pour la réalisation de la pénétration. Il est néanmoins concevable qu'une action mécanique joue un rôle pendant la pénétration. Quand une hyphe pénétrante arrive à la hauteur de l'épiderme le mécanisme défensif de l'insecte se met en action: les hémocytes peuvent dans certains cas former une espèce de pseudotissu, bloquant les hyphes pénétrantes.

A ce moment l'état physiologique de l'insecte, influencé par le milieu commence à jouer un rôle. En fait le terme 'état physiologique' indique souvent notre manque de connaissance: nous ne savons pas exprimer quantitativement cette

conception qui est composée d'une multitude de facteurs et qui est sans doute variable pendant la durée de la vie de l'insecte.

Il est probable qu'après avoir traversé la barrière des hémocytes, quand elle est du moins formée, l'hyphé va entrer en contact avec l'hémolymphé et ce sont probablement les mouvements de celui-là qui influencent la formation de blastospores, éléments réalisant l'infection totale. Mais cela n'est pas certain: on sait seulement par la culture en immersion des champignons entomopathogènes que les mouvements du liquide sont nécessaires pour pouvoir obtenir des blastospores: il paraît donc fort probable qu'on puisse extrapoler ces données pour le sang d'un insecte. La formation de blastospores, éléments se divisant comme des levures est un processus trouvé dans la majorité des cas d'infection par un champignon entomopathogène appartenant aux *Deuteromycetes*. Le cas d'*Aspergillus flavus* LINK (LEPESME, 1938) constitue cependant une exception.

La mort se produit normalement après la formation des blastospores. La cause exacte de la mort varie avec le champignon, bien que les auteurs diffèrent d'opinion sur ce point aussi. On trouve dans la littérature tantôt la détérioration des organes par des hyphes, tantôt le blocage des mouvements du sang par les blastospores ou encore le manque de nourriture consécutif aux besoins nutritifs du champignon et l'action des toxines. Dans certains cas la phagocytose peut jouer un rôle au début du développement des blastospores; il paraît tout de même probable que l'action phagocytaire des hémocytes n'arrive pas à freiner entièrement le développement des blastospores.

Une fois l'insecte mort les blastospores se transforment probablement en hyphes quand il n'y a pas concurrence avec d'autres microorganismes qui, après la mort pénètrent normalement dans le corps par le tube digestif. Si le champignon gagne la compétition, la majorité des tissus est utilisée pour le développement végétatif du champignon. Il semble que, dès ce moment là, l'insecte perde généralement beaucoup d'eau qui, combiné avec ce développement végétatif fait durcir le cadavre et en fait une momie. Ce processus de pathogénèse est la résultante de l'action du pathogène, les réactions de l'hôte et les facteurs du milieu agissant sur les deux organismes. L'action du pathogène et les réactions de l'hôte sont limitées par leurs compositions génétiques; la mesure du pouvoir pathogène du premier, la virulence, est en interaction constante avec le pouvoir de résistance de l'hôte.

REILLY, dans son cours de microbiologie de l'Institut Pasteur (1960-1961) donne cette définition: 'la virulence exprime la capacité pour un germe donné, à une certaine phase de son développement, de franchir les barrières protectrices d'un hôte déterminé, de surmonter ses mécanismes de défense et de proliférer dans ses tissus.'

Etant donné la différence du point de vue d'un pathologiste médical et d'un pathologiste d'insectes il me paraît utile d'ajouter: 'et de le tuer finalement'. Cela implique donc qu'on peut lier la conception 'virulence' qui résulte d'une multitude de capacités enzymatiques à quelque chose qu'on peut mesurer: le pourcentage de mortalité de la population de l'hôte provoqué par un certain

nombre d'unités (spores) de la population du pathogène. Quoique la virulence soit claire comme conception il paraît probable que quand on la mesure et l'exprime en pourcentage de mortalité elle ne sera pas la même pour chaque stade de l'hôte et qu'elle variera avec la voie d'infection. La mesure de la virulence aura donc toujours une valeur relative: elle est valable pour les conditions pendant l'essai, pour un certain stade, en tenant compte de la voie d'infection. En extrapolant on peut espérer qu'elle sera valable pour d'autres stades aussi, elle ne sera probablement pas valable pour une autre voie d'infection.

On se demande s'il n'y a pas possibilité de lier la virulence à un ou plusieurs caractères biochimiques du pathogène: production de chitinases, protéinases ou toxines, c.a.d. une évaluation *in vitro*.

Compte tenu de la complexité des facteurs déterminant la virulence cela ne paraît *a priori* pas improbable mais à cause de l'interaction des facteurs le test *in vitro* ne remplacera probablement jamais le test *in vivo*, sauf peut-être dans le cas d'un succès de mesure *in vitro* par la sérologie.

Comme moyens d'augmentation de la virulence on peut envisager: recombinaison de caractères 'positifs' (augmentant les chances pour le pathogène) de souches sauvages du pathogène (PONTORCO, 1949) ou changement des caractères héréditaires par des moyens physiques (EVLAKHOVA, 1958).

Même sur courte durée les caractères entomopathogènes des *Deuteromycetes* ne sont certainement pas quelque chose de stable, de déterminé.

En culture par exemple la virulence diminue après un nombre de repiquages relativement petit (SCHAERFFENBERG, 1964); un passage par l'hôte replacera la virulence à son ancien niveau.

On ne sait rien du changement de la virulence d'un champignon entomopathogène de la classe des *Deuteromycetes* dans une population - hôte sur une longue durée. Ici se pose la question si une résistance totale de l'hôte se développerait si la pression de sélection serait suffisamment élevée. Vu les observations avec les rouilles du blé, le développement d'une résistance totale paraît fort peu probable.

### 1.3. REPRODUCTION DU PATHOGENE

Nous connaissons très peu les facteurs qui influencent la sporulation d'un champignon entomopathogène sur un cadavre. Certainement les facteurs température, humidité relative et lumière jouent leur rôle. Il faut tout de même remarquer qu'un facteur comme l'humidité atmosphérique peut jouer un double rôle: une humidité assez élevée qui est probablement nécessaire pour le développement végétatif du champignon sur le cadavre peut précéder un besoin de sécheresse pour la formation des conidies.

Dans ce petit aperçu sont traités d'une façon générale un nombre de questions concernant l'étiologie des *Deuteromycetes* entomopathogènes. Il m'a paru possible de répondre à certaines de ces questions mais seulement en utilisant *un* insecte et *un* champignon.

Les recherches que j'ai fait furent suscitées par une publication de BALFOUR-



BROWNE (1960) intitulée: 'The Green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea'. L'observation d'une épizootie d'une importance tellement grande m'a mené à étudier les capacités pathogènes de *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOR. vis-à-vis de *Schistocerca gregaria* (FORSK.). Ce présent travail se propose d'éclaircir quelques uns des problèmes étiologiques évoqués par le récit de cette épizootie; la réponse aux questions ainsi posées est indispensable pour l'utilisation éventuelle de *M. anisopliae* dans la lutte biologique.

## 2. NOMENCLATURE DU CHAMPIGNON

### 2.1. HISTOIRE

En 1879 METSCHNIKOFF décrivait un champignon, parasite de *Anisoplia austriaca* HBST. et en donnait un dessin. Ce champignon formait, sous des circonstances favorables un stroma sur le cadavre de l'hôte. Là-dessus étaient formés ce qu'il appelle des stérigmes: des conidiophores, placées perpendiculairement sur la surface de l'insecte. Ces conidiophores, d'après METSCHNIKOFF se ramifiaient en forme de candélabre. Au bouts de ces conidiophores des 'corps ovales' étaient formés: maintenant on les appellerait des conidies. Metschnikoff décrivait la formation de ces conidies: chaque fois une conidie était émise sur le conidiophore. Il constatait donc que le chapelet qui était formé de cette façon était 'basipète'. Parce que les spores sont formées en chaînes il excluait les genres *Botrytis*, *Isaria* et *Empusa* et donnait finalement à l'organisme le nom *Entomophthora anisopliae* METSCHNIKOFF. Comme dimensions des conidies il donnait  $4,8 \times 1,6 \mu$ . En 1880 METSCHNIKOFF revenait sur le nom à cause d'une indication d'un botaniste, le Professeur CIENKOWSKY. Il appelait le champignon alors *Isaria destructor* METSCHNIKOFF.

SOROKIN (1883) faisait également des observations sur ce champignon sur *Anisoplia austriaca* HBST. Il voyait également la ramification en forme de candélabres des conidiophores et appelait ceux-ci et les phialides des 'stérigmes'. Comme dimensions pour les spores il donne aussi  $4,8 \times 1,6 \mu$ . Il remarquait que les chapelets très longs de spores sont agglutinés latéralement. Le nom *Entomophthora* est rejeté par SOROKIN: Il considère comme critère le plus important la formation des spores sur les 'stérigmes'. 'Il est évident', écrivait-il, 'que chez aucune forme apparentée à *Entomophthora* les premiers descendants (il voulait dire conidies) sont suivis sur le stérigme d'un deuxième, troisième etc. groupe de descendants, de façon que sur chaque stérigme toute une série de spores, se succédant en chaîne soit formée, qui, au moindre attouchement tombent en morceaux irréguliers'. En conséquence il introduisait un nouveau nom et appelait le champignon *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN. Plus tard les différents auteurs ont ajouté un r abusif à ce nom, utilisant *Metarrhizium*! Je continuerai cependant l'utilisation du nom *Metarrhizium*, ce qui est conforme aux règles de la nomenclature.

DELACROIX décrivait en 1893 un champignon entomopathogène sur *Melolontha melolontha* L. dont il croyait que c'était le même que celui décrit par METSCHNIKOFF. 'Les filaments fructifères sont simples ou peux rameux à cloisons un peu indécises, d'une dimension moyenne de  $3-3,5 \mu$ . Les conidies sont cylindriques, arrondies aux deux extrémités et forment des chapelets. Leur dimension varie de  $7$  à  $15 \mu$  de long sur  $2,5$  à  $3,25 \mu$  de large'. Delacroix n'indiquait pas que la formation des chaînes était basipète. Il appelait le champignon *Oospora destructor* DELACROIX.

VUILLEMIN (1904) mettait le champignon dans le genre *Penicillium*, le nom *Oospora* lui semblait incorrect parce que ce genre est hétérogène et mal défini.

VUILLEMIN décrivait aussi des chlamydospores, formées en culture, dont la forme varie mais était le plus souvent ovoïde. Il donne comme diamètre  $7-9\ \mu$ . Comme dimension moyenne des conidiospores cet auteur donne  $10,5 \times 2,5\ \mu$ . D'après cet auteur *Penicillium anisopliae* (METSCHNIKOFF) VUILLEMIN devrait être utilisé comme nom.

PETTIT (1895) changeait le nom en *Isaria anisopliae* (METSCHNIKOFF) PETTIT. Il pensait que le nom du genre, utilisé par METSCHNIKOFF (1880) devrait être gardé, mais combiné avec le nom d'espèce original. Comme dimensions des spores cet auteur donne  $6-7 \times 3\ \mu$ . Il décrivait une variété 'americana' qui aurait une croissance moins compacte et qui formerait des spores d'une couleur un peu plus claire. Le mycélium de cette variété aurait une couleur jaunâtre.

VON HOEHNEL (1908) isolait un champignon de *Cicada* spec. et constatait la grande similarité avec le champignon décrit ci-dessus, qui, dans la littérature anglo-saxonne était souvent indiqué avec le nom 'Green Muscardine'. D'après lui les spores auraient des dimensions de  $5-6 \times 1,5-2\ \mu$ . rarement avec une longueur de  $7\ \mu$ . Il appelait le champignon *Penicillium cicadinum* VON HOEHNEL. Néanmoins il ne trouvait pas que la ramification du conidiophore était typiquement penicilloïde.

Il y a encore deux autres espèces de *Metarrhizium* décrits comme des pathogènes d'insectes. Une, *Metarrhizium brunneum* PETCH (PETCH, 1934) diffère d'après PETCH de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN par la forme des phialides, qui sont, contrairement à *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOR. plus renflées. De plus la couleur des conidies diffère, elles sont jaune clair et brun en couches. Les dimensions des conidies sont:  $4-6 \times 1,2-2\ \mu$ .

LATCH (1965) examinait un champignon, déterminé par PETCH comme *Metarrhizium brunneum* PETCH. Chez ses propres isoléments LATCH trouvait une souche de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN dont les spores étaient brun foncé sur un agar de pomme de terre-dextrose. Il ne constatait pas de différences entre les phialides de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN et celles de *Metarrhizium brunneum* PETCH. Etant donné que la série d'hôtes dans ses essais correspond, il est de l'opinion que les deux espèces mentionnées ci-dessus sont identiques.

*Metarrhizium album* PETCH était décrit en 1931. 'Cette espèce diffère', d'après PETCH 'de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN par le mycélium blanc qui forme des coussinets'. Sur l'insecte les spores étaient probablement incolores mais pourtant en culture sur 'un milieu flocons d'avoine une couche de conidies jaunâtre-brunâtre était formée sur un stroma cotonneux'. Les phialides de *Metarrhizium album* PETCH différaient de celles de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN parce qu'elles sont arrondies au bout; les dimensions des phialides étant d'une longueur de  $8-10\ \mu$  et un diamètre de  $1,75\ \mu$ . Les dimensions des spores indiquées par PETCH étaient  $3-4 \times 1,75\ \mu$ , aussi contrairement (mais abusivement) à celles de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN. Parce qu'en culture les couches de spores

avaient également une couleur brun clair il n'y avait donc pas de différence de couleur évidente quant aux spores de *Metarrhizium album* PETCH et celles de *Metarrhizium brunneum* PETCH.

Pendant une visite au British Museum j'ai pu constater que le matériel type de PETCH pour *Metarrhizium album* PETCH ne consiste que d'un petit fragment d'un tégument d'insecte sur lequel quelques hyphes sont vaguement perceptibles. Je n'ai pas pu voir la forme des phialides. Il n'y a pas de culture disponible de *Metarrhizium album* PETCH. A ma connaissance le champignon n'aurait jamais été retrouvé. Il semble que *Metarrhizium album* PETCH est identique à *Metarrhizium brunneum* PETCH, qui à son tour paraît être semblable à *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN.

La nomenclature de la 'muscardine verte' reste toujours embrouillée. GORHAM (1923) utilisait encore le nom *Penicillium anisopliae*. Des chercheurs Japonais utilisent le nom *Oospora destructor* (METSCHNIKOFF) DELACROIX (AOKI, 1957; KAWAKAMI, 1960; KODAIRA, 1961; MORIMOTO, 1954).

SOROKIN donne du champignon découvert par METSCHNIKOFF une description et des dessins très précis qui correspondent parfaitement avec la description de METSCHNIKOFF. *Entomophthora* comme nom de genre est certainement inutilisable car ce genre est attribué à une autre classe (*Zygomycetes*). Ces observations de SOROKIN sont toutes faites sur un isolement du champignon et n'indiquent rien des variations des dimensions des conidies: Il n'y avait probablement que peu de différence dans ce seul isolement. Il n'y a pas de matériel type disponible mais la description et les dessins donnent une caractérisation assez bonne de l'organisme et pourraient éventuellement être utilisées comme type (LANJOUW et al., 1966).

Etant donné qu'il n'existe pas de matériel type un néotype (sensu TROUPIN, 1949) a été créé, provenant de plusieurs cadavres de criquets *Schistocerca gregaria* (FORSK.) sur lesquels le champignon sporulait. Ces criquets ainsi que les cultures du champignon sont déposés au C.B.S. (Baarn) Pays Bas. En conclusion la dénomination et la description s'établissent comme suit: nom valable: *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN (1883)

Basionyme: *Entomophthora anisopliae* METSCHNIKOFF (1879)

Synonymes: *Isaria destructor* METSCHNIKOFF (1880)

*Oospora destructor* DELACROIX (1893)

*Isaria anisopliae* (METSCHNIKOFF) PETTIT (1895)

*Penicillium anisopliae* (METSCHNIKOFF) VUILLEMIN (1904)

*Penicillium cicadinum* VON HOEHNEL (1909)

*Metarrhizium album* PETCH (1931)

*Metarrhizium brunneum* PETCH (1934)

Neotype: C.B.S. No. 289.67 isolé de *Schistocerca gregaria* (FORSK.), (VEEN, 1967).

#### Description:

Sur un agar Sabouraud de conservation un mycelium blanc plat se développe sur lequel d'abord les spores sont formées en petits 'îlots' (appelés sporodochies

par LATCH, 1965), plus tard les 'îlots' se rejoignent. Les spores secs adhèrent et forment des couches. Le mycélium se compose d'hyphes ayant un diamètre de  $1-3,5 \mu$  qui sont, hyalins, cloisonnés, ramifiés. Ils ont des parois minces. Les conidiophores formés sur le mycélium, sont ramifiés irrégulièrement vers le bas; les phialides, à l'extrémité des conidiophores forment une couche palissadique. Les phialides ont une forme cylindrique ou sont légèrement gonflées sur le côté où les spores sont formées. Leurs dimensions sont:  $8-11,5 \times 1,7-2,3 \mu$ . Les conidies, formées en chaînes basipètes ont une forme cylindrique et sont arrondies aux deux extrémités, parfois un des côtés est légèrement rétréci. Leurs dimensions sont:  $4,6-11,5 \times 2,3-2,9 \mu$  (moyenne:  $6,8 \times 2,4 \mu$ ).

## 2.2. FORMAE

JOHNSTON (1915) divisait *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN à cause des dimensions des conidies en deux 'forms' (formae): une *forma minor*, isolée d'une *Jasside* avec des conidies mesurant  $3-5 \times 2-3 \mu$  et une *forma major*, isolée d'*Oryctes* sp. ayant des conidies de  $11,9 \times 3 \mu$  (certainement seulement la valeur moyenne).

FRIEDERICH (1930) constatait aussi ces deux formes. Il ne trouvait la forme avec les grandes spores que sur *Oryctes* sp., sauf dans un cas (sur une larve d'un *Lamellicorne*). Cet auteur voulait appeler la forme aux grandes spores *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN *oryctophagum*. La forme aux petites spores (longueur  $6-8 \mu$ ) se produit d'après FRIEDERICH sur toutes sortes d'espèces d'insectes et également sur *Oryctes* sp.

RADHA et al. (1956) indiquent qu'aux Indes on trouve aussi bien la forme aux grandes spores que la forme aux petites spores. Ces formes étaient isolées respectivement d'*Oryctes rhinoceros* L. et de *Pyrilla* spec. Ces chercheurs observaient la forme aux grandes spores uniquement sur *Oryctes rhinoceros* L., la forme aux petites spores sur diverses insectes et aussi sur *Oryctes rhinoceros* L. A cause de la spécificité quant à la pathogénicité ces auteurs soupçonnaient des propriétés physiologiques spéciales chez la forme aux grandes spores, ils proposaient le nom *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN var. *rhinoceros* pour cette forme.

KAMAT et al. (1952) communiquent que les dimensions des spores d'un isolement de *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN de *Pyrilla* spec. cultivé sur un agar nutritif différaient considérablement (dimensions  $5-7,5 \times 2,3-3,5 \mu$ ) de celles formées sur du riz stérilisé ( $8-14 \times 3-4,5 \mu$ ). RADHA et al. (1956) indiquent que les formes varient peu ('remained more or less true to type'). J'ai en effet pu confirmer ces dernières observations par des mesurages de mes différents isolements sur des milieux nutritifs différents. Les différences étaient minimes. Des différents isolements de la collection, qui se trouvaient sur Sabouraud de conservation et jaune d'oeuf les dimensions des conidies étaient déterminées. La mensuration était effectuée en lactophénol-bleu coton.

Quant aux dimensions des différents isolements: il semble exister une transition relativement abrupte des formes avec les petites spores aux formes avec

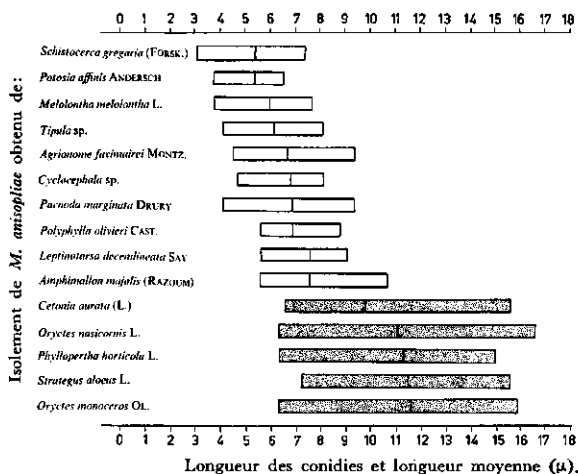


FIG. 1. Longueur des conidies d'une série d'isolements de *M. anisopliae*.

les grandes spores. Les longueurs des spores variaient de 3,1 jusqu'à 16,6  $\mu$ . Entre les isolements de *Amphimallon majalis* RAZOUM et *Cetonia aurata* L. il y a un écart considérable quant aux longueurs moyennes. A l'aide d'un test mathématique (test des écarts réduits) j'ai vérifié que les différences entre ces deux isolements étaient significatives, avec un risque extrêmement faible. Il apparaît dans la figure que la variation de longueur de chaque isolement des formes à longues spores est beaucoup plus prononcée que celle des formes à petites spores. De plus il paraît que la forme aux grandes spores n'a pas seulement comme hôte *Oryctes rhinoceros* L. mais peut également attaquer *Oryctes monoceros* OL., *Strategus aloeus* L., *Phyllopertha horticola* L. et *Cetonia aurata* L.

Partant de ces observations il n'y a donc pas de raison de rejeter la division entre une forme à grandes et une forme à petites spores. Les dénominations 'oryctophagum' de FRIEDERICHS et 'rhinoceros' de RADHA et al. pour les formes aux grandes spores ne paraissent pas appropriées. La vieille terminologie de JOHNSTON peut donc être maintenue au moins jusqu'au moment où sera isolée une forme ayant une longueur moyenne d'environ 8,5  $\mu$  sur jaune d'oeuf.

Le nom *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN f. (forma) minor (JOHNSTON, 1915) me paraît juste pour les isolements ayant une longueur moyenne ne dépassant pas 7,6  $\mu$  sur jaune d'oeuf tandis que pour les isolements ayant une longueur moyenne de 9,8  $\mu$  ou plus le nom *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN f. (forma) major (JOHNSTON, 1915) peut être utilisé.

### 2.3. LA FORME PARFAITE

TRYON (1914) suggère que sur *Lepidiota squamulata* = *Lepidiota albohirta* outre la forme imparfaite (*Metarrhizium*) il existerait une forme *Cordyceps*. Mais les caractères sur lesquels il s'appuyait ne sont pas très évidents. Probablement aurait-il observé des petites corémies, qui, plus tard étaient signalées par LATCH (1965). Dans certains cas on trouve en effet des hôtes sur lesquels le



PHOTOGRAPHIE 1.  
Formation de corémies de *M. anisopliae* sur un cadavre de *Polyphylla olivieri* CAST.

champignon forme des petits rameaux de quelques millimètres de long (voir photographie 1).

SCHAERFFENBERG (1959) communique avoir trouvé également la forme parfaite qu'il classe dans les *Ascomycetes*. Mais il n'en donne pas de nom. Ces observations, quoique intéressantes n'ont jamais pu être contrôlées.

### 3. ISOLEMENT, DÉVELOPPEMENT ET CROISSANCE IN VITRO, CONSERVATION

#### 3.1. ISOLEMENT

Pour l'isolement de *M. anisopliae* il y a trois possibilités principales: on peut d'abord enlever stérilement un morceau d'un insecte mycosé et le poser sur un agar nutritif. Je n'ai pas suivi cette méthode parce que les chances de contamination sont assez grandes.

RADHA et al. (1956) ont isolé *M. anisopliae* du sang d'*Oryctes rhinoceros* L. Cette méthode est en effet assez facile quand il s'agit d'insectes qui viennent de mourir on qui sont dans le stade précédant la mort. En enfonçant un capillaire stérile (pipette de Pasteur) dans le corps à une place qui a été auparavant désinfectée avec un peu d'éthanol 96 %, on peut enlever une goutte d'hémolymphe. Avec cette goutte on fait un frottis sur un milieu de culture favorable, un Sabouraud maltosé par exemple. Quand l'insecte est mort depuis plus longtemps on risque d'avoir des bactéries dans l'hémolymphe qui sont probablement entrées dans le corps par le tube digestif. Dans ce cas j'ai utilisé un milieu spécial d'isolement pour faire le frottis comme par exemple celui de MARTIN (1950).

La méthode d'isolement la plus pratique est celle utilisant des conidiospores provenant d'un cadavre mycosé. Beaucoup d'auteurs réalisent d'abord une désinfection de la surface de l'insecte à l'aide de l'alcool, l'hypochlorite de sodium ou le sublimé (MÜLLER-KÖGLER, 1965). Après rinçage avec de l'eau stérile on peut ou bien mettre l'insecte désinfecté tout de suite sur un agar nutritif ou déposer l'insecte en chambre humide stérile. Les spores formées sur la cadavre peuvent être enlevées aseptiquement etensemencées sur milieu de culture.

La méthode que j'ai suivie est la suivante:

Quand on recevait des cadavres, sur lesquels le champignon ne sporulait pas et qui étaient relativement propres, on les plaçait en chambre humide. Après formation de spores celles-ci étaient mises sur Sabouraud maltosé ou agar de cerise. Quand la culture se contaminait, les spores étaientensemencées sur un milieu spécial d'isolement (VEEN et FERRON, 1966) contenant du rose bengale, du chloramphénicol et de l'actidione pour empêcher le développement des bactéries et champignons envahisseurs, sans déranger la croissance de *M. anisopliae*.

Quand le champignon sporulait déjà sur les cadavres reçus les spores étaient mises tout de suite sur agar de cerise ou Sabouraud maltosé, en cas d'échec, sur le milieu spécial. De cette façon j'ai pu isoler le champignon de plusieurs espèces d'insectes. Les insectes, utilisés pour les isollements venaient des pays d'origine ou bien déjà mycosés ou bien ils développaient la maladie après un certain temps d'élevage à la Minière. En plus j'ai reçu trois souches isolées par le Dr. LATCH en Nouvelle Zélande (no. 21, 22, 23), une souche du C.B.S. – Baarn – Pays-Bas (no. 1) et deux souches de l'Institut de recherches phytopathologiques – Wageningen – isolées du sol (no. 24, 25).



Finalement la collection des souches de *M. anisopliae* était constituée comme suit :

No. Isolé de:	Milieu d'isolement :	Pays d'origine:
1. Inconnu; mycothèque la Minière, obtenu par le C.B.S.	?	?
2. <i>Oryctes nasicornis</i> L.	Martin	France.
3. <i>Melolontha melolontha</i> L.	Sabouraud	France.
5. <i>Strategus aloeus</i> L.	Sabouraud	Colombie, élevage.
6. <i>Cetonia aurata</i> (L.)	Cérise	France, élevage.
7. <i>Potosia affinis</i> ANDERSCH	Cérise	France, élevage.
8. <i>Polyphylla olivieri</i> CAST.	Cérise	Iran, élevage.
13. <i>Cyclocephala</i> sp.	Cérise	Argentine.
14. <i>Phyllopertha horticola</i> L.	Cérise	France, élevage.
15. <i>Oryctes monoceros</i> OL.	Cérise	Samoa, élevage.
16. <i>Tipula</i> sp.	Veen-Ferron	France.
17. <i>Schistocerca gregaria</i> (FORSK.)	Cérise	Erythrée.
18. <i>Pacnoda marginata</i> DRURY	Cérise	Côte d'Ivoire, élevage.
19. <i>Agrionome favimareii</i> MONTZ.	Cérise	Nouvelle-Calédonie.
20. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> SAY	Cérise	France, élevage.
21. <i>Costelytra zealandica</i> WHITE	?	Nouvelle-Zélande.
22. <i>Heteronychus sanctae-helenae</i> BLANCH.	?	Nouvelle-Zélande.
23. <i>Oxycanus</i> sp.	?	Nouvelle-Zélande.
24. Sol	Cérise	Pays-Bas
25. Sol	Cérise	Pays-Bas

Pour spécifier les souches je continuerai à utiliser cette numération.

### 3.2. DÉVELOPPEMENT ET CROISSANCE

Dans la littérature il y a de très nombreuses données concernant la culture de *M. anisopliae*. On peut distinguer deux buts de la culture :

- Culture en petites quantités, en tubes ou en boîtes de Petri pour des essais de laboratoire ou pour l'observation des caractères cultureux.
- Culture en masse pour la lutte biologique.

En plus une subdivision suivant la nature du milieu est possible :

- Culture sur milieu solide (gélosé ou naturel).
- Culture sur milieu liquide (culture flottante).
- Culture dans milieu liquide (culture immergée).

#### 3.2.1. Culture en petites quantités

Un milieu sur lequel le mycélium se développe bien n'est pas nécessairement bon pour la formation des spores. Pour obtenir des petites quantités de spores on peut utiliser toutes sortes de matériaux naturels stérilisés. Il y a de nombreuses données dans la littérature: GOUGH (1910) indique la pomme de terre, le riz, les carottes et les pois; PICARD (1913) le pain; RORER (1910) les haricots. Le champignon pousse et sporule également bien sur des agars contenant des décoctions de ces matériaux naturels.

Mais j'ai constaté que sur un milieu ne contenant que des sels minéraux comme par exemple le Czapek le champignon se développait également très bien.

MACLEOD (1954) indique un autre milieu artificiel pour la culture contenant du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  et du glucose. La plupart des informations ne fournissent que des données empiriques.

### 3.2.2. Culture flottante.

J'ai comparé la production de conidies sur des décoctions différentes. Comme critère j'utilisais la distance des 'pseudosporodochies', mesuré à l'oeil; comme souche j'employais la souche *M. anisopliae* no. 1. Les décoctions étaient préparées à la concentration de 3 % dans des boîtes de Roux, trois par série. La température pendant l'essai était maintenue à 27°C.

L'observation des résultats après un mois donne:

Milieu	Sporulation
Riz	±
Pomme de terre/carotte	+
Maïs	++
Flocons d'avoine	+++
Sabouraud	++++

### 3.2.3. Culture en masse

#### 3.2.3.1. Blastospores

ADAMEK (1965) indique la production de blastospores (éléments mycéliens se reproduisant comme des levures) par analogie avec la production de *Beauveria* en culture immergée. Il indique qu'après environ cinq jours la croissance de *M. anisopliae* atteint un maximum, c.a.d. un maximum de poids du mycelium, ce qui ne correspond pas nécessairement avec un maximum de blastospores. Le milieu d'Adamek consiste de glucose 4 %, extrait de levure (Difco) 4 % et de Corn Steep Liquor 3 %. Il paraît être nécessaire d'ajouter du Tween 80 en faible dose. Sans Tween 80 il n'y a qu'une formation de boules mycéliennes et les blastospores ne sont pas formées. Quoique cela ne soit pas indiqué il paraît probable qu'ADAMEK n'ait pas fait des essais avec des isoléments différents de *M. anisopliae*. Il m'a paru intéressant de comparer une dizaine de souches du champignon en tenant compte surtout de la production de blastospores.

Les essais étaient faits dans des erlenmeyers de 100 ml, contenant 30 ml du milieu d'Adamek, auquel était ajouté du Tween 80 à titre de 0,4 %. Pendant des essais préliminaires il a paru que le nombre de spores utilisées pour l'ensemencement influençait le moment auquel le maximum de la concentration en blastospores était atteint, mais la valeur absolue de ce maximum n'est pas influencée par la concentration de conidiospores de l'ensemencement. Les souches différentes étaient cultivées sur un Sabouraud de conservation. Les conidiospores étaient utilisées une semaine après le début de la sporulation. De cette façon j'espérais avoir des spores qui seraient toutes capables de germer.

Les spores étaient enlevées des tubes à l'aide d'une aiguille stérile et elles

étaient mises dans une solution stérile de Tween 80 de 1 %. Elles étaient mises en suspension à l'aide d'une barre magnétique.  $3 \times 10^7$  spores par Erlenmeyer étaient utilisées pour l'ensemencement c.a.d. un million de spores par ml de milieu d'Adamek. La température pendant les essais était maintenue à 27–28 °C; il y avait à peu près 430 agitations par minute. Des observations étaient faites toutes les 24 heures: j'enlevais un ml du milieu à l'aide d'une pipette stérile et les blastospores étaient comptées à l'aide d'une cellule de Bürker-Türk, éventuellement après dilution. Je définis les blastospores comme des éléments mycéliens isolés qui ne sont pas trois fois plus long que large.

Dans la majorité des cultures on trouve des tubes germinatifs 24 heures après l'ensemencement. Sur ces tubes se développent des bourgeons qui, par le mouvement, se détachent. Ces bourgeons (blastospores) continuent à se multiplier par bourgeonnement. Après 72 heures le milieu de culture est devenu déjà très épais et souvent on a de la difficulté à faire un prélèvement avec une pipette. Après 96 heures le milieu de culture est devenu presque compact, l'agitation n'est plus nécessaire et les blastospores se développent en hyphes plus ou moins longues.

J'utilisais comme souches pour ces essais: cinq souches de la *f. minor* de *M. anisopliae* (souches no. 3, 7, 17, 19 et 24) et cinq souches de la *f. major* (souches no. 2, 5, 6, 14 et 25). Les souches no. 24 (*f. minor*) et no. 25 (*f. minor*) étaient isolées du sol. Avec la majorité des souches on obtenait un taux de blastospores par ml entre  $10^8$  et  $10^9$ , sauf avec la souche 24 qui ne produisait que  $2,5 \times 10^7$  blastospores. La souche 17 n'a commencé son développement qu'après 48 heures.

### 3.2.3.2. Conidiospores

KRASSILTCHIK (1880) produisait des conidiospores en grandes quantités sur un milieu liquide dont il ne décrit pas la composition. A 25 °C il obtenait 180 à 220 grammes de spores par mètre carré après 14–15 jours.

RORER (1913) utilisait des conidiospores pour faire la lutte biologique, produites en grandes quantités sur du riz stérile en chambres de culture.

VOUK et KLAS (1931) produisaient également des conidiospores sur du riz stérilisé et calculaient que par mètre carré à peu près 320 grammes de spores étaient produites, en faisant la récolte quatre fois.

KALASHNIKOV (1939) a apparemment réalisé la production en grandes quantités sur des morceaux de pomme de terre en 15–20 jours. Il ne donne pas d'indications concernant le rendement.

J'ai essayé d'utiliser une méthode, indiqué par MC.COY et CARVER (1941) pour la production des conidiospores de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. Ces auteurs utilisaient du son humidifié et stérilisé. *M. anisopliae* pousse et sporule relativement bien sur ce milieu qui me paraissait tout de même manquer un peu de protéines. J'ai utilisé du riz cuit à la vapeur. Ce riz était déposé en grandes boîtes de Petri avec un diamètre de 20 cm, et autoclavé. Après refroidissement les boîtes de Petri étaient ensemencées et mises à une étuve à 27–28 °C.

Après environ un mois les boîtes de Petri étaient placées dans un réfrigérateur à  $+4^{\circ}\text{C}$  dans le noir. Elles étaient laissées là pendant une semaine pour dessécher. Par succion les spores étaient enlevées du milieu et récoltées sur papier filtre entre deux couvercles de dessiccateurs. Le rendement était à peu près 0,5 gr. de spores par boîte de Petri.

### 3.2.4. Développement et croissance: données complémentaires

Dans les pages précédentes j'ai donné quelques informations concernant le développement et la croissance d'une nature plutôt empirique. Quoique je n'aie pas fait des essais plus précis il me paraît néanmoins utile de compléter ce chapitre en faisant la mise au point bibliographique. Finalement il y a très peu de travaux s'occupant des aspects biochimiques de la physiologie de *M. anisopliae*. Surtout les publications de HUBER (1958), LIHNELL (1944) et VOUK et KLAS (1931) ont approfondi nos connaissances dans ce domaine. Il faut tout de même bien se rendre compte qu'il est dangereux de parler des aspects biochimiques de la physiologie de ce champignon et de comparer les données des différents auteurs, étant donné que des isolements différents d'un champignon entomopathogène peuvent varier considérablement.

#### 3.2.4.1. Influence de la température

La plupart des auteurs s'accordent à dire que l'optimum pour la croissance se situe entre  $25^{\circ}$  et  $30^{\circ}\text{C}$ . LIHNELL (1944) mesurait le poids du mycélium en culture flottante et trouvait un optimum de  $27^{\circ}$ – $30^{\circ}\text{C}$ .

LATCH (1965) faisait la comparaison de six isolements de *M. anisopliae*. Les optima de température de cinq de ces souches se trouvaient en effet entre  $25^{\circ}$  et  $30^{\circ}\text{C}$ , une souche formant une exception, ayant son optimum à  $20^{\circ}\text{C}$ . Il indique  $7^{\circ}\text{C}$  et  $35^{\circ}\text{C}$  comme respectivement minimum et maximum pour la croissance. Ces données correspondent donc assez bien avec celles de LIHNELL.

#### 3.2.4.2. Influence du pH

HUBER (1958) indique comme extrêmes de pH pour la croissance 3,3 et 8,5. Ces informations correspondent approximativement avec celles de LIHNELL (1944): extrêmes de pH 2,0–8,5 optimum pH 6,9. D'après VOUK et KLAS (1931) l'optimum de pH pour la formation des conidies se situe entre pH 6,9 et 7,4; d'après eux la croissance peut avoir lieu entre pH 4,7 et 10.

#### 3.2.4.3. Influence de la lumière

MÜLLER-KÖGLER (1960) observait que le pourcentage de germination du champignon, pendant les premières 24 heures de la germination était plus élevé dans l'obscurité qu'à la lumière.

CHENG et CHEN (1962) communiquent que la lumière est favorable pour la sporulation.

VOUK et KLAS (1931), au contraire, indiquent que la croissance et la sporulation sont retardées par la lumière.

Sur culture flottante j'ai observé une meilleure fructification dans la lumière diffuse que dans l'obscurité.

### 3.2.4.4. Influence de l'humidité relative

Je traiterai l'influence de l'humidité relative sur la germination des spores dans le chapitre 'germination' (5.).

Il y a vraiment peu d'information sur l'influence de l'humidité relative. Seuls VOUK et KLAS (1931) remarquent que ces facteurs sont très importants pour la croissance et surtout pour la fructification du champignon.

### 3.2.4.5. Valeur nutritive de différents constituants chimiques

Constituant	HUBER (1958)	LIHNELL (1944)	VOUK et KLAS (1931)
Acide butyrique		+	
Acide oléinique		+	
Acide palmitique		+	
Acide stéarique	+	+	
Alcool éthylique 5 %		+	
Amidon	+	+	
Arabinose	+		
Asparagine	+	+	+
Beurre		+	
Cellulose		—	
Chitine	+	+	
d-Alanine		+	
Dextrose	+		
d-Galactose	+		
d (-) Mannite	+	+	
Gelatine		+	
Glucose	+	+	+
Glycérine	+	+	
Glycocolé		+	
Glycogène	+		
Huile de soja	+		
Inuline			+
KNO <sub>3</sub>		+	+
K-palmitate		+	
Lévulose	+	+	
Maltose	+	+	
Na-acétate		+	
Na-carbonate		—	
Na-K-tartrate		—	
Na-stéarate		+	
NH <sub>4</sub> Cl		+	
NH <sub>4</sub> -tartrate		+	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		+	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			+
Saccharose	+	+	
Tannin		—	
Urée	+	—	

### 3.3. CONSERVATION

#### 3.3.1. Conservation au réfrigérateur

Pour la conservation des souches au laboratoire j'ai copié la technique, utilisée pour les *Penicillium* au C.B.S. (Baarn) Pays-Bas. Il fallait d'abord trouver des milieux de culture sur lesquels les différentes souches poussaient et sporulaient bien et surtout sur lesquels il n'y avait pas trop de mutations. Il paraissait que le Sabouraud de conservation et le jaune d'oeuf, coagulé à 80°C. (MÜLLER-KÖGLER, 1959) étaient particulièrement avantageux. Quand les isoléments commençaient à sporuler sur ces milieux les tubes étaient mis au réfrigérateur à +4°C. Les repiquages étaient toujours effectués inversement: du jaune d'oeuf sur Sabouraud de conservation et vice versa. Sous ces conditions on peut attendre six mois avec les repiquages. Même après 20 mois tous les repiquages des souches, provenant du jaune d'oeuf réussissaient. Mais sur le Sabouraud de conservation, matériel desséchant plus rapidement les spores paraissent perdre leur pouvoir germinatif plus précocement.

#### 3.3.2. Lyophilisation

Les souches étaient lyophilisées aussi, grâce à l'aide de l'Institut de Microbiologie de Wageningen et du C.B.S. (Baarn).

Les différents isoléments étaient ensemencés sur un Sabouraud de conservation à 27°C. Une semaine après le début de la sporulation les spores étaient récoltées et suspendues dans une solution de dextran 5 % et de Na-glutamate 1 %. Le pH était mis à 7,0. Très peu (0,1 ml) de la suspension était mis dans de petites tubes, fermés au coton. Les tubes restaient d'abord à +4°C. Ensuite ils étaient mis à une température de -15°C. Enfin les cultures étaient lyophilisées pendant 18 heures à -30°C. Les petits tubes étaient ensuite mis dans des tubes plus grands, contenant quelques cristaux de sulfate de cuivre anhydrique, qui étaient fermés sous vide. Après 11 mois un contrôle de viabilité était effectué. Les résultats étaient négatifs. Les différents isoléments étaient également lyophilisés au C.B.S. (Baarn) en lait écrémé (VON ARX, 1967). Après 6 mois presque toutes ces cultures étaient encore viables.

HESSELTINE, BRADLE et BENJAMIN (1960) communiquent que des spores lyophilisées de *M. anisopliae* étaient encore viables après 16 ans. Ces auteurs utilisaient probablement une suspension de spores dans un sérum de viande pour lyophiliser. La température pour cette méthode de lyophilisation était probablement plus élevée, quoique dans leur publication HESSELTINE et al. n'indiquent pas clairement que la méthode de lyophilisation est celle décrite in extenso par RAPER et ALEXANDER (1945).

#### 4. LISTE D'HOTES

BALFOUR-BROWNE (1960) donne une liste de 94 espèces d'insectes, sensibles à *M. anisopliae*.

LATCH (1965) remarque que cette liste est loin d'être complète et qu'une recherche bibliographique lui a montré qu'il y a plutôt 166 espèces d'insectes trouvés infectées dans la nature. LATCH ne donne que le nombre et ne spécifie pas de quelles espèces il s'agit. Un essai de revue complète de la littérature m'a montré qu'il y a au moins 204 espèces d'insectes qui sont sensibles à ce champignon. Dans la liste qui suit ne sont pas placés les insectes qui ont été trouvés sensibles pendant des essais de laboratoire car, par injection expérimentale, on peut probablement infecter presque chaque espèce d'insecte.

En regardant la liste on se rend compte que *M. anisopliae* est en effet très cosmopolite, mais que la plupart des observations sont faites dans des régions tropicales ou subtropicales. Cela correspond avec les données concernant l'optimum de température pour la croissance du champignon.

Peu d'observations concernent une vraie épizootie et dans la majorité des cas on n'a trouvé que quelques insectes isolés, attaqués par le champignon. On n'indique pas toujours si il s'agit de larves ou d'adultes.

Ce qui frappe surtout quand on observe cette liste, c'est le fait que dans l'ordre des *Coleoptera* 60 % des espèces sont des *Scarabaeidae*. Dans cette famille les larves ont surtout une vie souterraine. La même chose est vraie pour la famille des *Curculionidae*. Au moins trois quart des espèces sensibles à *M. anisopliae* de l'ordre des *Coleoptera* ont donc une vie souterraine comme larve. Cela nous mènerait à croire que *M. anisopliae* trouve les conditions les plus favorables pour attaquer des insectes dans le sol.

Cette liste était faite de façon à pouvoir choisir parmi les insectes une hôte particulièrement sensible à *M. anisopliae*.

#### ORTHOPTERA

##### ACRIDIDAE

<i>Acridium</i> sp.	Indonésie	ROEPKE (1915)
<i>Anacridium aegyptium</i> L.	Egypte	NATTRASS (1932)
<i>Cyrtacanthacris nigricornis</i> BURM.	Java	ROEPKE (1915)
<i>Melanoplus</i> sp.	U.S.A.	HYSLOP (1915)
<i>Nomadacris septemfasciata</i> SERV.	Rhodésie	LEWIN (1936)
<i>Schistocerca gregaria</i> FORSK.	Erytrée	BALFOUR-BROWNE (1960)
<i>Schistocerca paranensis</i> BURM.	Argentine	MARCHIONATTO (1942)
<i>Truxalis</i> sp.	Indonésie	ROEPKE (1915)

##### GRYLLOTALPIDAE

<i>Scapteriscus acletus</i> REHN et HEB.	U.S.A.	HAYSLIP (1943)
<i>Scapteriscus borelli</i> G-T.	Argentine	MARCHIONATTO (1942)
<i>Scapteriscus vicinus</i> SCUD.	U.S.A.	HAYSLIP (1943)

## DERMAPTERA

### FORFICULIDAE

<i>Forficula auricularia</i> L.	U.S.A.	BARSS et STEARNS (1925)
---------------------------------	--------	-------------------------

## HEMIPTERA

### MIRIDAE

<i>Helopeltis</i> sp.	Java	LEEFMANS (1916)
-----------------------	------	-----------------

### PENTATOMIDAE

<i>Scotinophara lurida</i> BURM.	Japon	KATSUMATA (1930)
----------------------------------	-------	------------------

### CERCOPIDAE

<i>Aeneolamia flavilatera</i> UR.	Barbados	JAMES (1946)
<i>Aeneolamia postica</i> WALK.	Trinidad	RORER (1910)
<i>Aeneolamia varia</i> FABR.	Trinidad	RORER (1913)
<i>Tomaspis flavopicta</i> STÅL.	Brésil	LEPAGE et MONTE (1942)
<i>Tomaspis humeralis</i> LEP. et SERV.	Brésil	LEPAGE et MONTE (1942)
<i>Tomaspis pictipennis</i> UHL. (= <i>saccharina</i> DIST.)	Trinidad	STEVENSON (1918)

### CICIDIDAE

<i>Cicada</i> sp.	Java	VON HOEHNEL (1909)
<i>Cicada viridis</i> STÅL.	Maurice	BALFOUR-BROWNE (1960)
<i>Magicicada septendecim</i> L.	U.S.A.	KATSURA et JOHNSON (1937)

### DELPHACIDAE

<i>Perkinsiella saccharicida</i> KIRK.	Hawai	MUIR (1921)
<i>Perkinsiella vastratrix</i> BREDDIN	Phillippines	BALFOUR-BROWN (1960)
<i>Saccharosydne saccharivora</i> WESTW.	Venezuela	GUAGLIUMI (1953)
<i>Pyrilla</i> sp.	Inde	JAGTAP (1958)

### FLATIDAE

<i>Ormenis pygmaea</i> F.	Puerto Rico	CAMUÑAS (1919)
<i>Phromnia marginella</i> STÅL.	Ceylon	BALFOUR-BROWNE (1960)

### COCCIDAE

<i>Cryptococcus</i> sp.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Cryptococcus punctulatus</i> SCODD	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Pseudococcus maritimus</i> EHRH.	Allemagne	OTT (1960)
<i>Pseudococcus</i> sp.	Maurice	BALFOUR-BROWNE (1960)

## LEPIDOPTERA

### AEGERIIDAE

<i>Vitacea polistiformis</i> HARRIS	U.S.A.	STEINHAUS et MARSH (1962)
-------------------------------------	--------	---------------------------

### AGROTIDAE

<i>Agrotis ypsilon</i> ROTT.	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)
<i>Alabama argillacea</i> HBN.	U.S.A.	STEINHAUS (1951)
<i>Cirphis unipuncta</i>	Argentine	MARCHIONATTO (1942)
<i>Euxoa atomaris</i>	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)
<i>Heliothis armigera</i> HBN.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Papaipema nebris</i> GN.	U.S.A.	DECKER (1931)
<i>Plathypena scabra</i> FABR.	U.S.A.	STEINHAUS (1951)
<i>Porosagrotis vetusta</i> WALKER	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)
<i>Prodenia irex</i>	Argentine	MARCHIONATTO (1942)
<i>Spodoptera exempta</i> WLK.	Hawai	PEMBERTON (1938)



<i>Spodoptera mauritia</i> BOISD.	Hawai	WILLIAMS (1931)
<b>ARTIIDAE</b>		
<i>Diacrisia virginica</i> F.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<b>BOMBYCIDAE</b>		
<i>Bombyx mori</i> L.	U.S.A.	GLAZER (1926)
<b>BRASSOLIDAE</b>		
<i>Brassolis sophorae</i> L.	Guyane Anglaise	CLEARE et SQUIRE (1934)
<b>CRAMBIDAE</b>		
<i>Diatraea saccharalis</i> F.	Trinidad	RORER (1913)
<i>Diatraea zeacolella</i> DYAR	U.S.A.	LEIBY (1920)
<b>EUCOSMIDAE</b>		
<i>Enarmonia pomonella</i> L.	France	STEINHAUS et MARSH (1962)
<b>GALLERIIDAE</b>		
<i>Galleria mellonella</i> L.	France	BOCZKOWSKA (1935)
<b>HEPIALIDAE</b>		
<i>Oxycanus</i> sp.	Nouvelle Zélande	LATCH (1965)
<i>Oxycanus cervinata</i> WALK.	Nouvelle Zélande	DUMBLETON (1945)
<b>NOTODONTIDAE</b>		
<i>Nerice davidi</i> OBTH.	Japon	KOBAYASI (1941)
<b>PHYCITIDAE</b>		
<i>Homoeosoma electellum</i> HULST	U.S.A.	SATTERTHWAIT et SWAIN (1946)
<b>PYRAUSTIDAE</b>		
<i>Diaphania hyalinata</i> L.	Cuba	MYERS (1932)
<b>SATURNIIDAE</b>		
<i>Samia cecropia</i> L.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Dictyoploca japonica</i> MOORE	Japon	KOBAYASI (1941)
<b>THOUMETOPOEIDAE</b>		
<i>Thaumetopoea pityocampa</i> SCHIFF.	France	BILIOTTI (1959)

## DIPTERA

<b>ASILIDAE</b>		
<i>Plesiomma</i> sp.	Cuba	JOHNSTON (1918)
<b>CHIRONOMIDAE</b>		
<i>Chironomus</i> sp.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<b>TIPULIDAE</b>		
<i>Tipula</i> sp.	France	VEEN (cette publication)
<b>TRYPETIDAE</b>		
<i>Rhagoletis suavis completa</i> CRESS.	U.S.A.	CHARLES (1941)

## HYMENOPTERA

<b>ICHNEUMONIDAE</b>		
<i>Amblyteles</i> sp.	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)
<b>PAMPHILIIDAE</b>		
<i>Cephaleia abietis</i> L.	Allemagne	DONAUBAUER (1962)

# SCOLIIDAE

<i>Campsomeris quadrifasciata</i>	Phillippines	BALFOUR-BROWNE (1960)
<i>Campsomeris (Tiphia?) radula</i> FABR.	Australie	JARVIS (1924)
<i>Campsomeris tasmaniensis</i> SAUSS.	Australie	JARVIS (1924)

# TIPHIIDAE

<i>Tiphia inornata</i> SAY	U.S.A.	STEVENSON (1918)
----------------------------	--------	------------------

## COLEOPTERA

### BYTURIDAE

<i>Byturus unicolor</i> SAY	U.S.A.	CHARLES (1941)
-----------------------------	--------	----------------

### CARABIDAE

<i>Amara obesa</i> SAY	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)
<i>Colpodes japonicus</i>	Japon	KOBAYASI (1941)
<i>Omus</i> sp.	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)

### CERAMBRICIDAE

<i>Ergates faber</i> L.	St. Margu�rite	FRIEDERICH (1919)
<i>Monochamus galloprovincialis</i> OL.	St. Margu�rite	FRIEDERICH (1919)
<i>Prionus</i> sp.	U.S.A.	STEINHAUS et MARSH (1962)
<i>Rhagium inquisitor</i> L.	St. Marguerite	FRIEDERICH (1919)
<i>Stenodontes insularis</i>	Japon	KOBAYASI (1941)
<i>Stenodontes spec.</i>	Samoa	FRIEDERICH (1920)

### CHRYSOMELIDAE

<i>Bronthospa mariana</i> SPAETH	U.S.A.	STEINHAUS (1951)
<i>Diabrotica longicornis</i> SAY	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Diabrotica vittata</i> F.	U.S.A.	CHITTENDEN (1919)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> SAY	Pologne	MAJCHROWICZ (1962)

### COCCINELLIDAE

<i>Epilachna</i> sp.	U.S.A.	CHARLES (1941)
----------------------	--------	----------------

### CURCULIONIDAE

<i>Apion aestivum</i> GERM.	Su�de	NOTINI (1938)
<i>Ceuthorrhynchus macula-alba</i> HERBST.	Hongrie	UBRIZSY et V�r�s (1962)
<i>Chalcodermus aenus</i> BOH.	U.S.A.	HETRICK (1946)
<i>Cleonus punctiventris</i> GERM.	Russie	METSCHNIKOFF (1879)
<i>Curculio carayae</i> HORN	U.S.A.	SWINGLE et SEAL (1931)
<i>Curculio elephas</i> GYLL.	Italie	COLIZZA (1929)
<i>Desmoris fulvus</i> LEC.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Diaprepes abbreviata</i> L.	Barbados	ANON. (1914)
<i>Diaprepes abbreviatus spengleri</i> L.	Porto Rico	JONES (1915)
<i>Graphognathus leucoloma</i> BOH.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Hypera nigrirostris</i> F.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Hypera punctata</i> F.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Hypera variabilis</i> HBST.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Metamasius hemipterus</i> L.	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Psalidium maxillosum</i> F.	Russie	KAVKAZSKAYA-TZEGE et MEDVEDEV (1944)

*Rhabdocnemis obscura* BOISD. =  
(*Rhabdoscelus obscurus* BOISD.)

<i>Rhyncophorus ferrugineus</i> OL.	Hawai	SPEARE (1912)
<i>Sitona</i> sp.	Ceylan	PETCH (1922)
<i>Sitona flavescens</i>	Angleterre	JACKSON (1934)
<i>Stenocarum fuliginosum</i> MARSH.	Ecosse	PETCH (1932)
	Moravie	ROZSYPAL (1941)

# ELATERIDAE

<i>Agriotus mancus</i> SAY	U.S.A.	PETTIT (1895)
<i>Agriotus obscurus</i> L.	Canada	FOX et JAUQUES (1958)
<i>Agriotes sputator</i> L.	Canada	FOX et JAUQUES (1958)
<i>Cardiophorus</i> sp.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Conoderus</i> sp.	U.S.A.	STEINHAUS et MARSH (1962)
<i>Conoderus vespertinus</i> FABR.	U.S.A.	STEINHAUS et MARSH (1962)
<i>Corymbites cupreus</i> F.	Angleterre	EDWARDS et EVANS (1950)
<i>Limonium californicus</i> MANNH.	U.S.A.	ROCKWOOD (1950)
<i>Ludius cylindriciformis</i> HBST.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Monocrepidius lividus</i> DEG.	U.S.A.	CHARLES (1941)

# LAMPYRIDAE

<i>Lampyrophorus</i> sp.	Ceylan	PETCH (1931)
--------------------------	--------	--------------

# SCARABAEIDAE

<i>Adoretus compressus</i> WEB.	Java	VAN DER GOOT (1915)
<i>Adoretus mauritianus</i> OHS.	Maurice	PETCH (1937)
<i>Adoretus tenuimaculatus</i>	Hawai	STEVENSON (1918)
<i>Adoretus umbrosus</i> FABR.	Hawai	SPEARE (1921)
<i>Alissonotum impressicollis</i> ARR.	Birmanie	GHOSH (1937)
<i>Alissonotum</i> sp.	Formose	CHENG et CHEN (1962)
<i>Amphimallon majalis</i> RAZ.	France	HURPIN et VAGO (1958)
<i>Amphimallon semivillosus</i> FAIR.	Maroc	MOUTIA (1940)
<i>Anisoplia austriaca</i> HERBST.	Russie	METSCHNIKOFF (1879)
<i>Anomala aenea</i> DEG.	Pologne	SIEMASZKO (1937)
<i>Anomala aureola</i> HOPE	Malaisie	CORBETT (1937)
<i>Anomala exicalis</i> PER.	S. Rhodésie	BÜNZLI et BÜTTIKER (1959)
<i>Anomala orientalis</i> WATERH.	Hawai	FRIEND (1929)
<i>Anomala</i> sp.	Hawai	SPEARE (1921)
<i>Aphodius</i> sp.	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Canthon</i> sp.	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Cetonia aurata</i> L.	France	HURPIN et VAGO (1958)
<i>Cetonia</i> sp.	France	VUILLEMIN (1904)
<i>Cnemidachnis portoricensis</i> SMYTH	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Cnemidachnis vandine</i> SMYTH	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Costelytra zealandica</i> WHITE	Nouvelle Zélande	LATCH (1965)
<i>Cotinis nitida</i> L.	U.S.A.	SWINGLE et SEAL (1931)
<i>Cotinis texana</i> CASEY	U.S.A.	PHILLIPS et FOX (1924)
<i>Cyclocephala</i> sp.	Argentine	VEEN (cette publication)
<i>Dermolepida albohirta</i> WATERH.	Australie	JARVIS (1916)
<i>Diloboderus abderus</i> STURM	Argentine	MARCHIONATTO (1942)
<i>Dynastes gideon</i> L.	Rhodésie	BUNZLI et BÜTTIKER (1959)
<i>Dyscinetus barbatus</i>	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Dyscinetus geminatus</i> F.	Guyane Anglaise	CLEARE (1933)
<i>Encyba condensata</i> GERST.	Madagascar	FRIEDERICH (1920)
<i>Geotrogus deserticola</i> BLANCH.	Algérie	MOUTIA (1941)
<i>Heteronychus sanctae-helenae</i> BLANCH.	Nouvelle Zélande	LATCH (1965)
<i>Holotrichia helleri</i> BRSK.	Java	STEVENSON (1918)
<i>Hylamorpha elegans</i> BURM.	Chili	DUTKY (1957)
<i>Lachnosterna anxia</i> LEC.	Canada	CHARLES (1941)
<i>Lachnosterna citri</i> SMYTH	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Lachnosterna consanguinea</i> BLANCH.	Inde	KALRA et KULSHRESHTA (1961)
<i>Lachnosterna fusca</i> FROEL.	Canada	CHARLES (1941)
<i>Lachnosterna futilis</i> LEC.	U.S.A.	CHARLES (1941)
<i>Lachnosterna rugosa</i> MELSH.	Canada	CHARLES (1941)

<i>Lachnosterna (Phytalus) smithi</i> ARR.	Barbados	BOURNE (1921)
<i>Lachnosterna</i> sp.	Porto Rico	VAN DINE (1913)
<i>Lepidiota albohirta</i> WATERH.	Queensland	TRYON (1914)
<i>Lepidiota frenchi</i> BLKB.	Australie	ILLINGWORTH et JARVIS (1918)
<i>Lethrus cephalotes</i> PALL.	Russie	METSCHNIKOFF (1879)
<i>Leucopholis voridae</i> F.	Java	GROENEWEGE (1916)
<i>Ligyris ebenus</i> DE G.	Guyane Anglaise	CLEARE (1930)
<i>Ligyris (Euetheola) rugiceps</i> LEC.	U.S.A.	PHILLIPS et FOX (1924)
<i>Ligyris tumulosus</i> BURM.	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Melolontha hippocastani</i> F.	Pologne	KARPINSKI (1949)
<i>Melolontha melolontha</i> L.	Pologne	SIEMASZKO (1937)
<i>Mimela splendens</i> BURM.	Japon	KOBAYASI (1941)
<i>Oryctes monoceros</i> OL.	Samoa (élevage)	VEEN (cette publication)
<i>Oryctes nasicornis</i> L.	Russie	POPELOV (1936)
<i>Oryctes radama</i> COQ.	Madagascar	FRIEDERICH (1920)
<i>Oryctes rhinoceros</i> L.	Samoa	FRIEDERICH (1920)
<i>Pacnoda marginata</i> DRURY	France	VEEN (cette publication)
<i>Pericoptus truncatus</i> FABR.	Nouvelle Zélande	LATCH (1965)
<i>Phyllopertha horticola</i> L.	France	LE MOULT (1893)
<i>Phyllophaga anxia</i> LEC.	Canada	HAMMOND (1940)
<i>Phyllophaga citri</i> SMYTH	Porto Rico	MARTORELL (1945)
<i>Phyllophaga drakii</i> KBY.	Canada	HAMMOND (1940)
<i>Phyllophaga fusca</i> FROE	Canada	HAMMOND (1940)
<i>Phyllophaga guanicana</i> SMYTH.	Porto Rico	CHARLES (1941)
<i>Phyllophaga futilis</i> LEC.	Canada	HAMMOND (1940)
<i>Phyllophaga portoricensis</i> SMYTH.	Porto Rico	MARTORELL (1945)
<i>Phyllophaga rugosa</i> MELSH.	Canada	HAMMOND (1940)
<i>Phyllophaga vandinei</i> SMYTH.	Porto Rico	MARTORELL (1945)
<i>Phytalus apicalis</i> BLANCH.	Porto Rico	CHARLES (1941)
<i>Phytalus insularis</i> SMYTH.	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<i>Phytalus smithi</i> ARROW	Maurice	STEVENSON (1918)
<i>Polyphylla barbata</i> CAZIER	U.S.A.	STEINHAUS et MARSH (1962)
<i>Polyphylla olivieri</i> CAST.	Iran (élevage)	VEEN (cette publication)
<i>Popillia japonica</i> NEWM.	U.S.A.	HADLEY (1938)
<i>Potosia affinis</i> ANDERSCH.	Argentine (élevage)	VEEN (cette publication)
<i>Rhizotrogus carduorum</i> ER.	Maroc	MOUTIA (1940)
<i>Rhizotrogus solstitialis</i> L.	France	HURPIN et VAGO (1958)
<i>Strategus aloeus</i> L.	Colombie (élevage)	VEEN (cette publication)
<i>Strategus barbigerus</i> CHAPIN	Porto Rico	CHARLES (1941)
<i>Strategus quadrioveatus</i> BEAUV.	Porto Rico	PLANK (1948)
<i>Strategus</i> sp.	Porto Rico	CHARLES (1941)
<i>Strategus titanus</i> SMYTH	Porto Rico	STEVENSON (1918)
<b>SCOLYTIDAE</b>		
<i>Dendroctonus terebrans</i> OL.	U.S.A.	HOLT (1961)
<i>Stephanoderes hampei</i> FERR.	Indonésie	FRIEDERICH (1922)
<i>Sternotomis maculata</i> Hintz.	Madagascar	FRIEDERICH (1920)
<b>TENEBRIONIDAE</b>		
<i>Eleodes opaca</i> SAY	U.S.A.	McCOLLOCK (1919)
<i>Embaphion muricatum</i> SAY	U.S.A.	WADE et BÖVING (1921)
<i>Tenebrio molitor</i> L.	U.S.A.	HYSLOP (1915)

## 5. GERMINATION ET DÉVELOPPEMENT DES TUBES GERMINATIFS

### 5.1. MORPHOLOGIE DES CONIDIES ET LEUR POUVOIR GERMINATIF

#### 5.1.1. Morphologie des conidies

Les conidies de *M. anisopliae* peuvent varier considérablement de dimensions en rapport avec l'isolement étudié (voir 2.2.): longueur 3,1–16,6  $\mu$ ; largeur 2,5–5,6  $\mu$ . Je me suis surtout intéressé à la souche 17, isolée de *S. gregaria*. La forme des spores est généralement cylindrique avec des extrémités arrondies. Avec le microscope ordinaire on ne peut pas observer beaucoup de détails dans les spores: le contenu de la cellule est souvent granuleux, aux deux extrémités il y a des gouttelettes ayant une réfraction plus élevée, ce qui est encore plus caractéristique au contraste de phase. De façon à pouvoir étudier plus de détails j'ai observé les spores de la souche *M. anisopliae* no. 17 à l'aide du microscope électronique (VEEN, 1967), grâce à l'aide du Service Physique et Technique de Wageningen.

Les spores ont une paroi épaisse, dont l'extérieur est plus électrodense que l'intérieur. L'extérieur est cannelé. L'intérieur de la spore est entouré d'une membrane mince qui donne l'impression d'être lamellée. Dans cette membrane on trouve un ou deux grands corps, formant presque entièrement l'intérieur de la spore. Ces corps peuvent contenir des granules. Un petit espace apparaît entre ces corps (entourés eux aussi d'une paroi infime) et la membrane. Aux deux extrémités ou à l'une d'elles seulement il y a des gouttelettes très peu électrodenses qui apparemment n'ont pas de paroi et qui parfois se dégradent dans l'endoplasme. Dans les coupes (voir photographie 2) observées à l'aide du microscope électronique je n'ai jamais trouvé plus qu'un noyau qui est entouré d'une



PHOTOGRAPHIE 2.

Conidiospore de *M. anisopliae*. Noyau avec une membrane double au centre. Coloration: Acétate d'Uranyle. Agrandissement 14000  $\times$ .

parois double. Je n'ai pu observer que très peu de mitochondries, dû probablement au fait que les spores, utilisées pour faire les observations avec le microscope électronique n'avaient pas du tout eu la chance de commencer leur germination.

#### 5.1.2. *Conservation du pouvoir germinatif*

On ne sait pas si, dans des conditions naturelles dans la nature, les conidio-spores sont capables de survivre longtemps. Il y a une série d'observations peu précises et qui semblent être contradictoires concernant le pouvoir germinatif des spores de *M. anisopliae*, probablement parce que les auteurs ne se sont pas rendu compte de l'influence de l'hydratation des spores.

Nous savons que ces spores supportent mal une température relativement peu élevée: d'après VOUK et KLAS (1931) on peut tuer les spores en les mettant à une température de 60°C pendant 5 minutes. Ces observations correspondent presque avec celles de JOHN PULLE (1938), qui communique qu'en traitant les spores en suspension pendant 30 minutes à 50°C ou 5 minutes à 55°C elles ne germaient plus.

BOCZKOWSKA (1935) indiquait que la longévité des spores dépassait une année, GLASER (1926) mentionne même qu'après trois ans au sec les spores de *M. anisopliae* pouvaient encore germer. LATCH (1965), au contraire, constatait qu'après onze mois les spores ne germaient déjà plus. ROCKWOOD (1950) ne pouvait plus obtenir la germination des spores de cultures âgées de 18 mois. D'après MORIMOTO (1954) les spores restent au moins 6 mois viables dans l'air humide et seulement 23 jours dans de l'air sec. VOUK et KLAS (1931) ne trouvaient qu'un pourcentage de germination de 1 % parmi des spores âgées de trois ans.

Des observations plus précises étaient faites par CLERK et MADELIN (1965). Ces auteurs tenaient compte de la température, l'humidité relative et l'illumination pendant leurs essais. Les spores survivaient le plus longtemps à une température basse (8°C), à l'obscurité et dans une humidité relative de 75 %. Quant à l'influence de l'humidité relative sur le pourcentage de survie des spores, ils trouvaient qu'il y a un minimum de survie à 45 % d'humidité, tandis qu'en dessous et au dessus de 45 % le pourcentage de survie des spores augmente: il y aurait donc un degré critique, le plus défavorable pour la survie qui serait de 45 % d'humidité relative mais qui serait susceptible de se déplacer jusqu'à 65 % après lavage des spores.

Dans des conditions naturelles c'est peut-être dans un hôte, mort de mycose que le champignon peut rester vivant le plus longtemps. De toute façon j'ai pu isoler *M. anisopliae* de cadavres de criquets, provenant d'Erythrée après six ans (VEEN, 1967).

#### 5.1.3. *Evaluation du pouvoir germinatif*

Pendant la germination des spores de *M. anisopliae* un ou plusieurs tubes germinatifs sont formés. Dans mes essais j'ai conçu une spore comme germée quand un tube germinatif était au moins aussi long que la largeur de cette spore.

MÜLLER-KÖGLER (1960) décrit un test de germination pour quelques champignons entomopathogènes, parmi lesquels se trouve *M. anisopliae*. Ce test était réalisé sur un milieu nutritif gélosé et était conçu pour la pratique de la lutte biologique. Mais il me semble qu'il n'est pas sûr que des spores, germant bien sur un milieu nutritif gélosé peuvent également bien germer sur le tégument d'un insecte ou dans sa salive ou dans le contenu des différentes parties du tube digestif. En principe il fallait concevoir un test de germination d'après la voie de pénétration que le champignon doit emprunter.

## 5.2. CONDITIONS EXTRINSÈQUES ET INTRINSÈQUES INFLUENÇANT LA GERMINATION

### 5.2.1. Conditions extrinsèques

Parmi les conditions extrinsèques qui peuvent influencer la germination il faut mentionner la température, la présence d'eau de condensation, la lumière, la surface sur laquelle les spores germent, le pH, la présence de matières nutritives et la tension d'oxygène. Je n'ai pas eu l'intention d'épuiser ce sujet, je me suis concentré surtout sur l'influence de l'humidité relative et sur l'influence de la surface sur laquelle les spores germent.

Quoique les facteurs température, pH, lumière et présence de matières nutritives n'aient pas fait l'objet d'études particulières, les résultats des différents auteurs concernant la croissance peuvent très probablement être transposés à la germination, étant donné que la plupart de ces essais étaient conduits avec des conidies. Je peux donc résumer ces résultats, qui n'étaient obtenus qu'avec un nombre de souches réduit, comme suit: Entre des températures de 10°C et 35°C les spores peuvent germer. La lumière semble influencer d'une façon négative la germination des spores pendant les premières 24 heures (MÜLLER-KÖGLER, 1960). Entre des pH de 3,3 et 8,5 les spores semblent pouvoir germer.

#### 5.2.1.1. Influence de l'humidité relative in vitro et in vivo

##### Essais in vitro.

Dans la littérature on trouve beaucoup d'indications sur l'humidité relative comme facteur limitant l'utilisation des champignons entomopathogènes (BAIRD, 1958; BUCHER, 1964). Mais, finalement, il y a très peu de données exactes. Concernant *M. anisopliae* il n'y a qu'une seule indication: celle de CLERK et MADELIN (1965) qui rapportent que l'humidité la plus basse permettant aux conidies de germer se trouve entre 93 et 97 % d'humidité relative à 25°C. Apparemment ces auteurs ont travaillé avec des solutions de sels saturées pour régler l'humidité relative.

SCHEIN (1964) attire l'attention sur le fait qu'au dessus d'une humidité relative de 90 % une baisse de température d'un degré suffit pour atteindre le point de rosée. D'après lui la précision pendant les essais doit être 0,1°C. Pour mes essais j'ai utilisé des conidies de la souche *M. anisopliae* no. 17 formées sur un Sabouraud de conservation standard et âgées au plus d'une semaine après le début de la sporulation. A l'aide d'un pinceau j'ai mis les spores sur une lame,

trempée dans une solution étherique des matières grasses de l'épicuticule de *S. gregaria*. Les lames étaient mises dans des bouchons fermant le couvercle en plastic d'une cloche de verre épais. Sur le couvercle un petit moteur était monté, dont l'axe, pénétrant à travers le couvercle était muni d'une hélice à l'extrémité. De cette façon l'air à l'intérieur de la cloche pouvait être brassée (Voir photographie 3). La cloche était placée dans une étuve bien ventilée, dont la température (27°C) ne variait pas plus d'un dixième de degré C. Etant donné l'inertie de la cloche la température dans l'intérieur variait donc extrêmement peu.

Pour réaliser une humidité déterminée j'ai utilisé des solutions de chlorure de calcium à des concentrations de 15, 10 et 5 %. Les humidités correspondant à ces concentrations sont à 27°C respectivement 89, 92 et 94 %. Dans ces diverses conditions je n'ai pas pu observer la germination d'une spore. Et même en mettant de l'eau bi-distillée au fond de la cloche je n'ai pu obtenir la germination des conidies, quoique l'équilibre de l'humidité relative était obtenu après environ une demi-heure (mesuré avec une sonde sur le principe de changeurs d'ions, aimablement fourni par le laboratoire de Physique de l'Université de Wageningen). L'humidité relative au dessus de l'eau dans une cloche fermée se mesure difficilement mais doit être 98 % approximatif.

Pour me rendre compte si les spores peuvent germer sur une lame graissée quand il y a condensation sur la surface j'ai procédé comme suit: les lames graissées étaient mises dans un bouchon fermant un Erlenmeyer contenant quelques ml d'eau bi-distillée. Ces Erlenmeyers étaient placés dans l'obscurité dans une étuve dans laquelle la température variait de 26 à 28°C. Dans ces conditions la germination des conidies de la souche *M. anisopliae* no. 17 commence après 12 heures et on peut atteindre un pourcentage de germination dépassant 50%. Etant donné que dans ces dernières conditions il y a de la condensation sur les lames il paraît que les conidies de *M. anisopliae* no. 17 ont besoin de l'eau liquide pour leur germination.

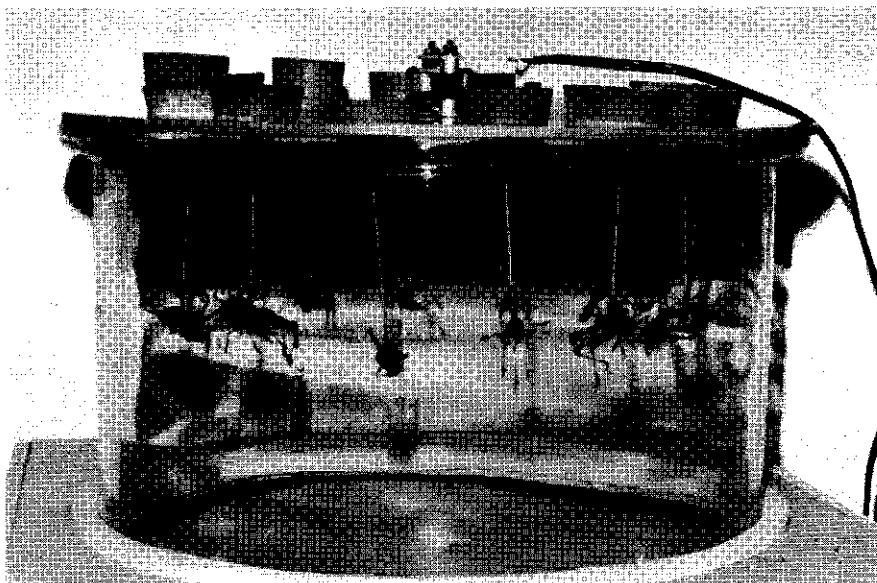
#### Essais in vivo.

MÜLLER-KÖGLER (1965) attire l'attention sur le fait qu'à cause de l'évaporation l'insecte doit être enveloppé par un microclimat qui, surtout quand l'insecte se trouve sur une feuille, peut différer considérablement de celui de l'ambiance. Chez *S. gregaria* la transpiration cuticulaire est à peu près un tiers de celle qui se fait par les stigmates. Il est donc en effet concevable que cette transpiration aide ou fait commencer la germination. Pour vérifier cette hypothèse j'ai fait quelques essais.

L'élevage des criquets est décrit en 9.2.

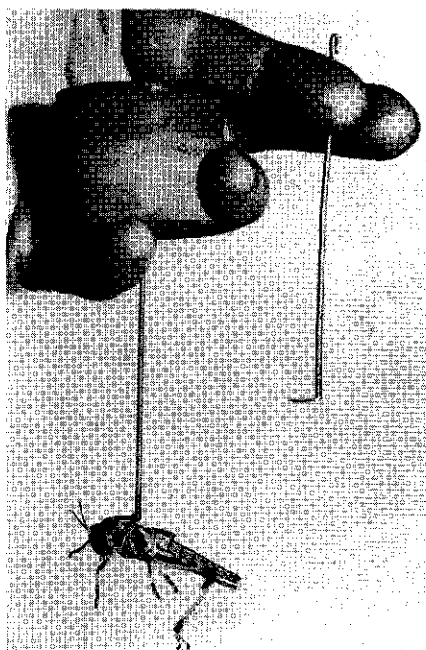
Des larves du cinquième stade de *S. gregaria* venant de muer étaient montées à des barres de cuivre dorsalement sur le thorax, à l'aide de cire (Photographies 3 et 4). Ces barres étaient attachées à des bouchons de caoutchouc fermant le couvercle en plastic, mis sur la cloche en verre décrite dans le paragraphe précédent. Les larves étaient traitées à l'aide d'un pinceau avec des conidiospores d'une culture jeune (une semaine au plus après le début de la sporulation). La cloche était placée à une température de  $27 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Dans le fond de la





PHOTOGRAPHIE 3.

Appareil à humidité réglable avec quelques larves de *S. gregaria* pour des essais de germination in vivo. Egalement utilisé pour le contrôle de la germination in vitro.



PHOTOGRAPHIE 4.

Méthode de fixation d'une larve de *S. gregaria* à une barre de cuivre.

cloche j'avais mis de l'eau bi-distillée. Sous ces conditions d'humidité très élevée (au dessus de 97 %) les larves restaient vivantes à peu près pendant cinq jours. Pour observer la germination des spores sur le tégument je me suis servi d'un dispositif épiscopique 'ULTROPAK' de Leitz, qui est surtout utilisé pour la recherche des surfaces de métaux. Sans coloration on ne peut pas voir les spores, même pas en lumière polarisée. On peut seulement obtenir une bonne coloration quand les spores commencent à germer et surtout quand il y a des tubes germinatifs. J'ai réalisé la coloration en enfonçant l'abdomen des larves, préalablement tuées à l'acétate d'éthyle, dans une solution de bleu coton au lactophénol. Après cinq minutes les larves étaient enlevées du colorant et soigneusement lavées à l'alcool 96 %. Les spores germées, colorées bleu foncé, sont surtout bien visibles sur les stries blanches qui se trouvent sur les sclérites latéraux de l'abdomen. Deux essais étaient faits: avec et sans brassage de l'air. De ces deux conditions il y avait seulement possibilité de formation d'un microclimat environnant quand l'air n'est pas brassé. Il n'y eut pas de germination dans aucun des deux cas et dans les cinq jours de survie des larves. Apparemment il doit se produire aussi de la condensation sur les larves pour que les spores puissent germer, ce qui n'est pas provoqué par la transpiration de l'insecte, même pas sur les stries blanches de l'abdomen. On peut supposer que les conditions microclimatiques sont encore différentes sur les plis des membranes intersegmentaires.

Pour faire condenser de l'eau sur les larves contaminées avec des spores provenant d'un Sabouraud de conservation comme je viens de décrire, chaque barre de cuivre avec une larve était montée sur un bouchon de caoutchouc qui fermait un Erlenmeyer dans lequel se trouvait de l'eau bi-distillée. Les Erlenmeyers étaient mis dans l'obscurité dans une étuve à une température de 26–28°C. Dans ces conditions les spores commençaient à germer après 16 heures (Photographie 5). Après 20 heures le pourcentage de germination était 24,7 % et n'augmentait presque plus (500 spores contrôlées).

Il paraît donc qu'aussi in vivo, sur le tégument d'un criquet, les spores de *M. anisopliae* ne germent que quand le point de rosée est atteint. Certains essais étaient fait sur des lames graissées parce que, comme il sera démontré dans la paragraphe suivante, la germination des spores est influencée par les lipides épicuticulaires de *S. gregaria*.

#### 5.2.1.2. Influence de la surface

Cette influence peut être d'une nature physique ou chimique. Il y a apparemment une influence physique indirecte de la surface sur laquelle on dépose les



PHOTOGRAPHIE 5.  
Germination des conidiospores de *M. anisopliae* observée à l'aide du système ULTROPAK. Agrandissement  $\pm 500 \times$ .

spores. J'ai aperçu une condensation beaucoup plus rapide et intense sur la partie d'une lame traitée avec les matières grasses de l'épicuticule de *S. gregaria* que sur la partie non traitée dans une atmosphère où le point de rosée était atteint.

On peut très bien suivre la condensation et la germination en utilisant des lames creuses. Autour de la concavité j'ai mis une pâte silicone (Bayer) et dans la concavité très peu d'eau bi-distillée. La concavité était fermée avec une lamelle à moitié trempée dans une solution étherique des matières grasses de l'épicuticule du criquet. La lamelle était couverte avec des conidiospores de la souche *M. anisopliae* no. 17. On observe une condensation rapide sur la partie graissée de la lamelle. Il paraît qu'il y a surtout condensation autour des spores qui semblent agir comme noyaux de condensation. Les spores restent sur place. Quand, finalement, il y a aussi de la condensation sur la partie non graissée de la lamelle les spores ne restent pas sur place mais se déplacent vers l'extérieur de la goutte de condensation. Il paraît donc exister une attraction entre les matières grasses de l'épicuticule et la paroi de la spore, qui, d'après NOTINI (1944) est entourée d'une couche très mince de matières grasses.

Dans un essai j'ai comparé la germination des spores provenant d'une culture de Sabouraud de conservation sur laquelle la sporulation avait eu lieu pendant une semaine sur des matières différentes. J'ai comparé la germination sur des lames très propres, sur des lames couvertes avec du collodion, des matières grasses de l'épicuticule de *S. gregaria*, ou de la cire. Les essais étaient faits à une température qui variait de 26 à 28°C. De cette façon j'ai toujours pu constater de la condensation sur les lames traitées des différentes façons. Sur collodion il n'y a aucune germination, sur le verre très peu (moins qu'un pourcent), sur de la cire peu (2,3 % après 40 heures) et 21,3 % sur les matières grasses de l'épicuticule du criquet. Les différences entre les pourcentages de germination sur les matières grasses de l'épicuticule d'une part et sur les autres substances de l'autre sont très significatives. J'ai également constaté que les spores ne germent pas dans de l'eau distillée ce qui confirme les observations de GABRIEL (1959). Il me paraît donc évident qu'il y a une substance chimique dans l'épicuticule du criquet pèlerin qui influence d'une façon positive la germination des conidiospores de la souche no. 17 de *M. anisopliae*. Cela correspond avec des observations de NOTINI (1944) sur *Cossus cossus* L.

Koidsumi (1957) au contraire a constaté une action inhibitrice des lipides cuticulaires de *Bombyx mori* L. vis-à-vis de la croissance du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus* Link. Des observations semblables sont données par EVLAKHOVA et SCHEKHYRINA (1963). Il paraît donc que les matières grasses de l'épicuticule peuvent jouer un rôle important dans la première phase du processus de l'infection et dans les cas où l'infection n'a lieu que par le tégument on peut penser qu'elles peuvent déterminer les chances d'infection de diverses espèces d'insectes.

### 5.2.2. Conditions intrinsèques

On pense d'abord au potentiel spécifique de la matière vivante puisque la

spore représente la forme la plus fréquente et la plus caractéristique sous laquelle le champignon est susceptible de se multiplier et par conséquent de se reproduire. Nous ne pouvons donc pas négliger les caractères héréditaires des spores de chaque souche de *M. anisopliae*. Plusieurs auteurs (e.g. PONTOCORVO) ont attiré l'attention sur les possibilités de modification de la virulence consécutives à certaines recombinaisons génétiques ou mutations. Dans un mycélium comme celui de *M. anisopliae* où il y a plusieurs noyaux par cellule il est très bien possible que certains noyaux aient des caractères héréditaires différents (le phénomène d'hétérokaryose est bien connu parmi les *Fungi Imperfecti*). Etant donné que les conidies de *M. anisopliae* ne contiennent qu'un noyau (VEEN, 1967), la variabilité des caractères entre les conidies pourraient être considérable.

Après les travaux de GROVER (1964), on sait que le milieu de culture, utilisé pour faire croître un champignon entomopathogène et le faire sporuler peut influencer le pouvoir germinatif des spores. Chez *Aspergillus flavus* LINK il paraît que, quand certains acides aminés manquent dans le milieu de culture, les spores formées sur ce milieu ne peuvent germer que quand on ajoute justement cet acide aminé au liquide dans lequel les spores sont mises à germer.

Pour me rendre compte de l'influence du milieu de culture j'ai comparé les pouvoirs germinatifs d'une forma minor (*M. anisopliae* no. 17) et d'une forma major (*M. anisopliae* no. 15), produites sur un milieu Czapek-Dox modifié (Difco) et un milieu Sabouraud de conservation. Après des essais préliminaires il paraissait préférable de faire pousser les cultures dans l'obscurité car la lumière semble influencer défavorablement le pouvoir germinatif.

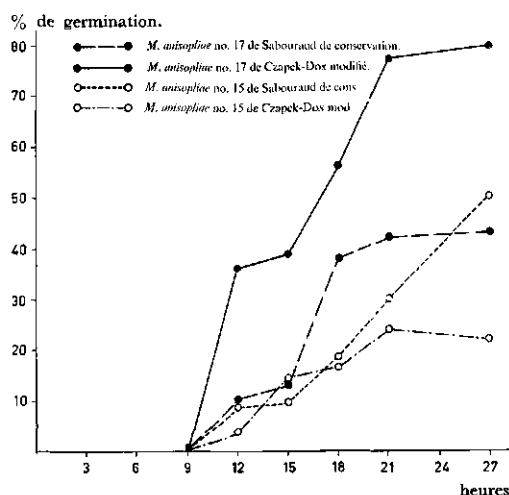
Les essais étaient exécutés de la façon suivante:

Des lames porte-objet très propres étaient trempées dans une solution éthérique des lipides épicuticulaires de larves du cinquième stade de *S. gregaria*, de sorte que la quantité de matières grasses sur les lames était identique. A l'aide de pinceaux les spores des différentes cultures étaient mises sur ces lames. Les lames étaient montées sur des bouchons de caoutchouc qui fermaient des récipients contenant quelques millilitres d'eau bi-distillée. Les récipients étaient mis dans l'obscurité dans une étuve dans laquelle la température variait de 26 à 28 °C. Les lames étaient disposées parallèlement pour que la condensation sur les lames soit comparable. Toutes les trois heures, 500 spores étaient contrôlées. Je n'ai observé que les spores qui étaient libres, donc pas en contact avec d'autres spores. Pendant la nuit les lames avec les spores étaient mises dans des boîtes de Pétri qui contenaient quelques ml. de formol 40 % sur un triangle en verre. On peut garder ces boîtes de Pétri quelques jours dans un réfrigérateur et déterminer le pourcentage de germination quand cela convient (ZADOKS et GROENEWEGEN, 1967).

Les résultats de ces essais sont donnés dans la figure 2. Les différences entre les souches et entre les milieux de culture pour la souche *M. anisopliae* no. 17 sont significatives.

Si la germination sur des lames porte-objet couvertes avec des lipides épicuticulaires était comparable avec la germination sur le tégument cela impliquerait

FIG. 2. Germination des conidies de deux souches de *M. anisopliae* provenant de deux milieux de culture.



pour la pratique de la lutte biologique dans le cas où l'infection ne pourrait être réalisée que par le tégument qu'il faudrait bien choisir le milieu pour faire la culture de masse de conidiospores.

### 5.3. DÉROULEMENT DE LA GERMINATION JUSQU'AU DÉBUT DE LA PÉNÉTRATION

Sur des lames couvertes de lipides épicuticulaires de *S. gregaria* on peut bien suivre la germination au contraste de phase. On peut alors voir une couche un peu noirâtre sur la graisse. La spore gonfle légèrement avant qu'un tube germinatif apparaisse. Parfois, mais rarement il y a deux tubes germinatifs. Sur les lames graissées les tubes germinatifs peuvent s'allonger considérablement en formant des cloisons. Souvent le cytoplasme de la spore disparaît dans le tube germinatif et la spore reste vide. Quand le tube germinatif a une longueur d'à peu près  $10\ \mu$  on peut voir que la couche noirâtre est dissoute (Voir photographie 6). A son extrémité terminale le tube germinatif est parfois gonflé et il y a là une structure qui ressemble beaucoup à un appressorium. Mais à la place de cet 'appressorium' on ne voit le début d'hyphes pénétrantes que très rarement et parfois il n'y a pas gonflement du tube germinatif à l'endroit où une hyphe commence à pénétrer. Mais il est évidemment concevable que *in vitro* il n'y a pas l'attraction de l'insecte vivant et que, en conséquence, il manque le stimulus pour la formation d'hyphes pénétrantes.

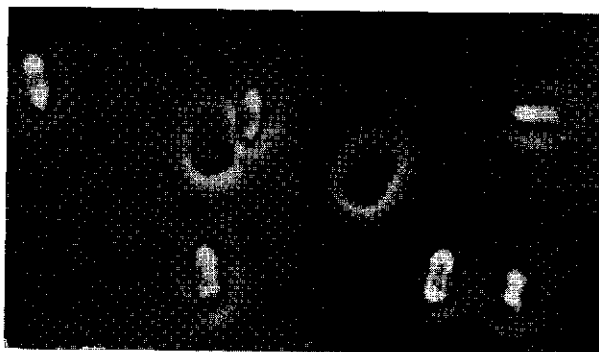
*In vivo* (Photographie 5) il y a aussi la formation de gonflements terminaux des hyphes mais là on ne peut pas voir avec l'ULTROPAK si des tubes pénétrèrent en dessous de ces 'appressoria'.

Etant donné que la pénétration du champignon peut se passer dans la bouche j'ai également observé la germination des conidies en salive stérile. En prenant des larves du cinquième stade elles laissent souvent tomber une goutte de salive.



PHOTOGRAPHIE 6.  
Germination des conidies de  
*M. anisopliae* in vitro sur une  
couche des lipides épicuticulai-  
res de *S. gregaria*. Contraste de  
phase.

Cette salive est très visqueuse et doit être diluée dans l'eau distillée. Par filtrage millipore on obtient un liquide stérile légèrement brunâtre. Quelques gouttes de ce liquide étaient mises sur une lame stérile qui restait sur un triangle en verre dans une boîte de Pétri stérile. Pour que la salive ne se dessèche pas il faut mettre quelques ml d'eau stérile dans la boîte de Pétri. Sur les lames on peut très bien suivre la germination des spores. Cette méthode est qualitative mais pas quantitative parce que la salive est diluée. J'ai comparé la germination de deux souches, une forma minor (*M. anisopliae* no. 17) et une forma major (*M. anisopliae* no. 15). Les conidies se gonflent avant qu'un tube germinatif apparaisse, un phénomène généralement connu chez beaucoup d'espèces de champignons. Celles de la souche *M. anisopliae* no. 17 deviennent presque sphériques ou prennent une forme de poire (Photo 7). Il peut résulter probablement de ce gonflement que les spores qui sont absorbées par les larves s'attachent dans les plis de la bouche sans être déplacées par les mouvements du bol alimentaire.



PHOTOGRAPHIE 7.  
Gonflement des conidiospo-  
res de *M. anisopliae* en salive  
des larves de *S. gregaria* (flè-  
ches). Contraste de phase.  
Agrandissement  $\pm 1500 \times$ .

Il est possible que la dimension et la rapidité du gonflement soient des facteurs déterminants de la virulence. Après 48 heures le pourcentage de germination dans la salive stérile peut atteindre 95 %. Quand les spores sont germées et quand les tubes germinatifs se développent on peut observer aussi la formation d'excroissances terminales, peut-être comparables aux 'appressoria'.

## 6. PÉNÉTRATION ET INFECTION

### 6.1. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

En ce qui concerne la voie et le mode de pénétration de *M. anisopliae* chez différents insectes on trouve quelques données dans la littérature. Souvent les conclusions ne sont pas le résultat d'investigations histologiques et dans ces cas leur interprétation doit être faite avec beaucoup de prudence.

En appliquant par exemple des spores sur le tégument, on risque fort de contaminer aussi la nourriture quand on ne prend pas des précautions spéciales. Inversement en administrant des spores par la méthode d'ingestion forcée, on risque d'infecter le tégument quand les animaux (probablement les larves de *Lepidoptera*) ont tendance de régurgiter.

Quelques auteurs observaient des taches rougeâtre-brunâtre sur la place où ils avaient appliqué les spores. Complété par une étude histologique l'observation de ces taches donne une bonne indication concernant la place de pénétration.

Actuellement les auteurs s'accordent à dire que la pénétration est le résultat d'une action physique (pression) (WALLENGREN et JOHANSSON, 1929; ROBINSON, 1966) et chimique (production de chitinases, lipases, protéinases etc). In vitro l'action de ces enzymes a été démontré (HUBER, 1958). JAGTAP (1958) communique que le champignon ne peut pas pénétrer par les parties sclérotisées du tégument de *Pyrilla* sp. On ne sait pas si généralement le champignon préfère par exemple la membrane intersegmentaire comme place de pénétration.

Ici suit une liste des données bibliographiques concernant la place de pénétration:

Auteur:	Insecte:	Place de pénétration:
BOCZKOWSKA (1935)	<i>Galleria mellonella</i> L.	Tégument
CHENG et CHEN (1962)	<i>Alissonotum</i> sp.	Tégument
GABRIEL (1959)	<i>Galleria mellonella</i> L.	Tégument et Tube digestif
	<i>Bombyx mori</i> L.	Tégument et Tube digestif
	<i>Tenebrio molitor</i> L.	Tégument et Tube digestif
HURPIN et VAGO (1958)	<i>Melolontha melolontha</i> L.	Tégument et Tube digestif
MASERA (1957)	<i>Bombyx mori</i> L.	Tube digestif
NOTINI et MATHLEIN (1944)	<i>Cossus cossus</i> L.	Stigmates et Membranes intersegmentaires
	<i>Ephestia kühniella</i> (ZELLER)	Tégument et Bouche
PILASH (1938)	<i>Loxostege sticticalis</i> L.	Tégument et Tube digestif
	<i>Pieris brassicae</i> L.	Tégument et Tube digestif
	<i>Agrotis segetum</i> SCHIFF.	Tégument et Tube digestif
	<i>Anisoplia austriaca</i> HBST.	Tégument et Tube digestif
	<i>Bothynoderes punctiventris</i> GERM.	Tégument et Tube digestif
ROBINSON (1966)	<i>Tenebrio molitor</i> L.	Tégument
SCHAEFFENBERG (1959)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (SAY)	Tégument et Tube digestif
	<i>Musca domestica</i> L.	Tégument et Tube digestif
SOROKIN (1883)	<i>Anisoplia austriaca</i> HBST.	Tégument
WALLENGREN et JOHANSSON (1929)	<i>Pyrausta nubilalis</i> Hb.	Tégument



Les résultats de GABRIEL et de MASERA semblent être contradictoires: d'après MASERA il est impossible d'infecter *Bombyx mori* L. avec *M. anisopliae* par le tégument. Mais il est concevable que les diverses variétés de *Bombyx mori* L. se comportent différemment quant à la place de pénétration du champignon.

## 6.2. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Pour étudier les voies de pénétration j'ai souvent suivi des méthodes histologiques. Pour me rendre compte si un certain phénomène pouvait avoir lieu j'ai toujours utilisé le stade larvaire le plus approprié. Evidemment, quand pour un certain stade une voie de pénétration a pu être mise en évidence il n'est pas sûr que chez d'autres stades cette même voie ait pu être suivie également quoique cela paraisse probable. Des larves ou des parties de larves dans lesquelles une place de pénétration était à déterminer étaient fixées dans le Bouin, généralement sous vide. Dans ce but les objets étaient alors mis dans des petits Erlenmeyers contenant du Bouin. Les Erlenmeyers étaient ensuite mis dans une cloche à vide dans laquelle j'ai fait le vide plusieurs fois, jusqu'au moment où les préparations restaient au fond des Erlenmeyers. Au moins trois jours après la fixation les préparations passaient par les bains suivants:

Ethanol 70 %: 60 minutes  
Ethanol 80 %: 60 minutes  
Ethanol 90 %: 60 minutes  
Ethanol 96 %: 60 minutes

Ensuite: benzoate de méthyle jusqu'au moment de la chute des préparations. Benzoate de méthyle et 2 % celloidine: au moins trois jours (pour des préparations larges: 10 jours).

Benzol I: 10 minutes  
Benzol II: 10 minutes  
Benzol III: 10 minutes  
Paraplast I: 10 minutes  
Paraplast II: 10 minutes  
Paraplast III: 10 minutes

Ensuite: inclure au paraplast sous vide. Je préfère le paraplast (Brunswick, Worthing, Angleterre) à la paraffine, le paraplast s'attache mieux aux préparations.

### 6.2.1. Colorations

J'ai surtout suivi la méthode d'AMARGIER et VAGO (1966) pour déterminer la place de pénétration. Cette coloration est moins appropriée pour suivre les hyphes dans le tissu. Pour cela j'ai utilisé une coloration selon TCHANG YUNG-TAI (1929) qui donne une très bonne différenciation dans les tissus. La méthode de Palma et Young (MÜLLER-KÖGLER et al., 1965) qui, d'après les auteurs sem-

ble donner de très bons résultats pour *Beauveria tenella* (DELACR.) SIEMASZKO chez *Melolontha melolontha* L. n'a donné que de faibles résultats. Il paraît donc qu'il faut choisir pour chaque combinaison insecte/champignon la coloration la plus appropriée.

### 6.3. PASSAGE DES CONIDIOSPORES PAR LE TUBE DIGESTIF

Une première indication pour une possibilité de pénétration dans la bouche ou le tube digestif est le pouvoir des spores de passer par le tube digestif. On offrait individuellement à 20 larves du troisième stade de *S. gregaria*, qui avaient jeûnées pendant 24 heures, une feuille de *Poa annua* L. sur laquelle se trouvaient approximativement  $10^6$  spores de la souche *M. anisopliae* no. 1. Seulement quatre de ces larves consommaient cet aliment. Ces larves étaient placées dans une cage avec de la nourriture et leurs crottes étaient ramassées après 24 heures. Après agitation avec de l'eau stérile et des billes de verre stériles, ces crottes étaient finement diluées en suspension. Un ml. de cette suspension était mis à l'aide de pipettes stériles sur un agar spécial d'isolement (VEEN et FERRON, 1966). Après six jours d'innombrables petites colonies se trouvaient sur l'agar qui pouvaient être identifiées comme *M. anisopliae*.

Le même essai répété avec 5 larves du cinquième stade de *S. gregaria* qui ne disposaient que de 150.000 spores avec leur aliment. Ensuite elles étaient laissées à jeûner pendant 67 heures, étaient changées de cage et obtenaient une nourriture normale. Leurs crottes étaient ramassées pendant les 24 heures suivant le changement de cage. Pour le reste l'expérimentation se passait comme il est décrit ci-dessus. Je n'ai pas pu isoler le champignon de leurs crottes sur le milieu spécial d'isolement. Quatre de ces cinq larves mouraient toutefois à cause de l'infection cryptogamique. Les spores de *M. anisopliae* peuvent donc transiter par le tube digestif, mais elles sont tuées après un séjour prolongé. Il est fort probable qu'une partie des conidies germe et cause une infection par la bouche (chapitre suivant) tandis que le reste passe le tube digestif.

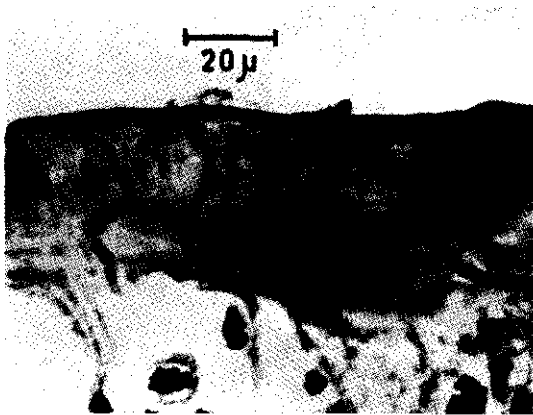
### 6.4. INFECTION ORALE

Dans une publication précédente (VEEN, 1966) j'ai décrit comment on faisait absorber à des jeunes larves de deuxième stade de *S. gregaria* une forte dose de spores avec une feuille de *Poa annua* L. La souche utilisée pour ces essais était la souche *M. anisopliae* no. 1. Après l'administration des spores 6 larves étaient fixées toutes les six heures dans le Bouin. Avec cette souche j'ai pu démontrer que 54 heures après le début de l'essai des hyphes se trouvaient dans la partie proximale des palpes maxillaires. Ce processus d'infection se passait aussi quand l'humidité relative de l'ambiance était assez basse (en dessous de 50 %). Après l'administration des spores les têtes des larves étaient nettoyées avec de l'éthanol absolu pour enlever et tuer les spores qui étaient restées à l'extérieur de la tête. De cette façon on risque d'enlever des fractions de l'épicuticule, ce qui pourrait intervenir avec le processus d'infection. J'ai donc répété ces essais

avec la souche *M. anisopliae* no. 17, mais cette fois sans nettoyer la tête. Les résultats étaient comparables avec ceux déjà décrits. Il n'était pas nécessaire de faire une série de fixations toutes les six heures par exemple. En observant les larves bien attentivement on peut reconnaître les premiers symptômes de la maladie par le fait que les larves qu'on irrite ne sautent plus aussi rapidement que les larves saines. Je n'ai fixé de ces larves malades que celles qui n'avaient que très peu de petites blastospores dans le sang ou celles qui n'en avaient pas du tout. Quand les larves ont beaucoup de blastospores dans le sang la maladie est déjà trop avancée et on ne peut plus se rendre compte où la place de pénétration se trouvait. De toute façon l'information concernant la place de pénétration n'a toujours été qu'indirecte, c.a.d. que je n'ai jamais trouvé le point de pénétration des hyphes. Celui-ci doit correspondre à l'emplacement où l'on trouve les premières hyphes dans les tissus. La souche *M. anisopliae* no. 17 agit moins rapidement que la souche *M. anisopliae* no. 1: on ne trouve les premiers hyphes dans les palpes maxillaires qu'après 90 heures, mais seulement quand on utilise une souche fraîche, qui a été isolée récemment de *Schistocerca*. L'humidité relative dans les cages ne semblait pas jouer un rôle pendant le processus d'infection avec la souche *M. anisopliae* no. 17, ce qui est évident, étant donné que les spores germent dans la salive des larves. Je n'ai pas pu constater d'autres endroits de pénétration que la bouche.

#### 6.5. INFECTION PAR LE TÉGUMENT

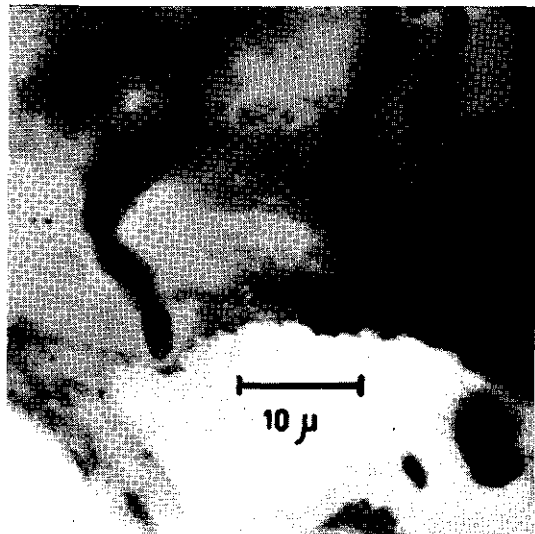
Six larves du troisième stade de *S. gregaria* qui venaient de muer étaient saupoudrées avec des conidiospores de la souche *M. anisopliae* no. 8. Les larves étaient mises avec un peu de nourriture dans une enceinte en plastic close au fond et au dessus par une toile de nylon. Cette enceinte était mise dans un vase de verre bien fermé dans lequel se trouvait de l'eau. La température pendant l'essai variait de 26 à 28°C, en conséquence le point de rosée était atteint. La durée d'éclairement était de douze heures. Après 30 heures j'ai pu constater, grâce à la méthode ULTROPAC (voir 5.2.1.1.) que les spores du champignon avaient commencées à germer. Après 54 heures le sang de ces larves était contrôlé pour voir si il y avait des blastospores présents, ce qui est très facile à constater au contraste de phase. Deux de ces six larves montraient des blastospores, elles étaient fixées dans le Bouin, incluses et les abdomens étaient coupés transversalement. On peut très bien suivre le cours des hyphes dans les tissus. Dans la chitine (Photographie 8) on peut voir un éclaircissement autour et au bout des hyphes, du à l'action des chitinasés et protéinasés qui font dissoudre les tissus. Il semble curieux que sous l'action de ces enzymes la paroi des hyphes elle-même ne soit pas attaquée, il est pourtant connu que la plupart des champignons contiennent de la chitine dans leur paroi. CLAUS (1961) qui travaillait avec *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL., un autre champignon entomopathogène, indique que la production des chitinasés n'est pas facultatif mais que la sécrétion des chitinasés coïncide avec la lyse du matériel fongique à la fin de la période de croissance. Cela n'explique évidemment pas du tout le phénomène de pénétra-



PHOTOGRAPHIE 8.  
Pénétration des hypes de *M. anisopliae* par le tégument d'une larve de *S. gregaria*.

tion. Une meilleure hypothèse serait que la chitinase du champignon n'entre pas en contact avec la chitine du champignon, c.a.d. que la paroi des hyphes serait composée de plusieurs couches et que la couche extérieure ne porterait pas de la chitine. (Voir AINSWORTH et SUSSMAN 1965). WALLENGREN et JOHANSSON (1929) observaient que là où le champignon pénétrait les lamelles qui formaient l'endocuticule de l'insecte étaient poussées vers l'intérieur dans la direction de la croissance du champignon. Ils concluaient alors qu'en plus de l'action des enzymes une action physique (pression) devait intervenir dans le processus de la pénétration.

La photographie 9 donne aussi l'impression que sur la place où la pointe d'une hyphe avance, le tissu (la partie intérieure de l'endocuticule) est poussé vers l'intérieur du corps de l'insecte. Le tissu poussé de côté ne diffère pas des



PHOTOGRAPHIE 9.  
Bout d'une hyphe pénétrante de *M. anisopliae* au bord de l'endocuticule, détail de la photographie 8.

autres tissus au même niveau, autrement on pourrait penser à une réaction de l'insecte qui donnerait une formation de nouveau tissu à la place où le champignon pénètre. Ces observations confirmeraient donc les observations de WALLEN-GREN et JOHANSSON.

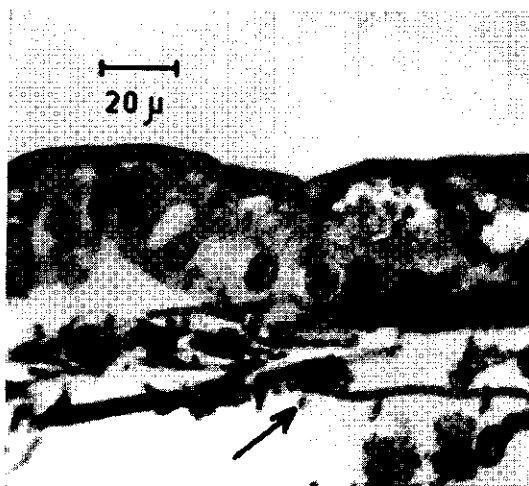
Dans aucune de mes coupes d'ailleurs je n'ai pu observer une réaction de défense de la part du criquet: ni la formation d'un pseudo-tissu par les hémocytes (OGLOBLIN et JAUCH, 1943), ni une phagocytose des éléments cryptogamiques par les hémocytes comme cela a été observé par KAWAKAMI (1965) chez *Bombyx mori* L. Il est imaginable que chez *S. gregaria* ce mécanisme de défense est bloqué par l'action des toxines du champignon.

L'observation de séries de coupes m'a montré qu'il n'y a pas un endroit spécial où le champignon pénètre. Tout dépend de la chance des spores de rester à leur emplacement pendant la germination. A la base de poils, à l'origine des membranes intersegmentaires, dans des sutures, partout où les spores ne sont pas enlevées par les mouvements de l'insecte j'ai pu observer des endroits de pénétration. La direction des hyphes de pénétration était presque toujours approximativement perpendiculaire au tégument; les hyphes ne faisaient que rarement des détours dans la chitine.

#### 6.6. INFECTION RECTALE

Pour ces essais j'ai utilisé des larves du cinquième stade de *S. gregaria* qui venaient de muer. Une suspension de conidiospores de la souche *M. anisopliae* no. 17 était injectée dans le rectum des larves à l'aide d'une aiguille sans pointe. La plus grande partie de l'aiguille était recouverte d'un tuyau en plastic, afin de ne laisser libre que trois millimètres de l'aiguille. Sans tuyau on risque de pénétrer dans la paroi du tube digestif. Cinq séries de 10 larves, qui avaient jeûnées pendant six heures recevaient ainsi une injection de  $2 \times 10^6$  conidiospores, tandis que les 10 larves de la série témoin recevaient une injection d'eau. Je supposais qu'à cause du mouvement des excréments les spores seraient probablement enlevées. Les larves des cinq séries étaient mises en présence d'aliment après l'injection respectivement après 0, 15, 24, 39 et 48 heures. J'attendais que, surtout dans la dernière série, les mouvements des excréments interviendrait le moins dans le processus d'infection. Les larves restaient pendant l'essai à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , l'humidité relative était en dessous de 50 %, la durée d'éclairement était de 17 heures.

Après trois jours quelques larves mouraient de la maladie cryptogamique, après six jours toutes les larves traitées au champignon étaient mortes. Dans leur sang j'ai pu trouver des blastospores de *M. anisopliae*. Dans la série témoin deux des larves étaient mortes mais pas par le champignon. Apparemment il n'y a pas d'influence des mouvements des excréments. L'étude histologique m'a montré que le champignon pénètre à travers la paroi du rectum. Dans certaines coupes j'ai pu observer la formation des blastospores (Voir photographie 10). Les blastospores sont formées quand les hyphes atteignent des cavités dans les tissus, là où il y a probablement irrigation sanguine. En culture



PHOTOGRAPHIE 10.  
La formation des blastospores de *M. anisopliae* dans le tissu d'une larve de *S. gregaria* (flèche).

immergée le champignon ne forme également des blastospores que lorsque le milieu de culture est agité.

Quand on donne à des larves des spores de *M. anisopliae* à absorber il y a donc une double chance d'infection: par la bouche et par le rectum. Mais probablement cette dernière chance d'infection doit être réduite: une partie des spores risque d'être tuée dans le tube digestif où les spores sont mélangées avec beaucoup de nourriture. La chance qu'un nombre suffisant de spores adhère aux parois du rectum pour réaliser l'infection semble bien faible.

Il n'est pas clair pourquoi une infection dans d'autres parties du tube digestif n'est pas possible. La seule indication est que la zone de pénétration dans les essais d'infection par le rectum est limitée à la partie terminale où l'on peut supposer une oxygénation suffisante. Probablement la tension d'oxygène dans le tube digestif n'est pas suffisamment élevée pour permettre la germination des spores. BUCHER (1960) en fait même une règle générale pour la plupart des insectes: 'Thus aerobic potential pathogens probably are starved for oxygen in the gut of most insects and this may account for their inability to multiply.'

#### 6.7. ESSAIS D'INFECTION PAR LES STIGMATES

Sous des conditions d'humidité moyenne les essais d'infecter des larves du cinquième stade avec des conidiospores de *M. anisopliae* par les stigmates, ne donnaient que des résultats négatifs.

## 7. DERNIÈRE PHASE DE LA MALADIE

### 7.1. L'INVASION

Dès le moment que les hyphes du champignon ont atteint le sang il y a une formation de blastospores. Ces blastospores se divisent comme des levures et se multiplient également par bourgeonnement. Les cellules sanguines se désintègrent pendant ce processus de multiplication. Quand les mouvements du sang diminuent d'intensité les blastospores commencent à se ramifier et deviennent des hyphes. A ce moment là on peut voir toutes sortes de bactéries dans l'hémolymphe qu'on peut isoler facilement en faisant des frottis.

### 7.2. SYMPTÔMES EXTERNES PENDANT L'INVASION

Le moment que le champignon a commencé à pénétrer dans les tissus d'un criquet coïncide avec un manque d'appétit de l'insecte. A ce moment là, le comportement de l'insecte peut être d'ailleurs parfaitement normal mais parfois on peut constater que l'irritabilité diminue. Les criquets ont par exemple tendance à montrer un délai plus ou moins marqué quant à leur saut après être touché. La mue est retardée, mais il n'est pas sûr que cela est le résultat direct de l'action du champignon: le manque de matières de réserve à cause de la nutrition interrompue peut également expliquer ce fait.

Les mouvements diminuent de plus en plus, ce qui coïncide souvent avec la présence de quelques blastospores unicellulaires dans le sang. Dans cette phase de la maladie, les criquets réagissent de moins en moins à des stimuli externes mais ils se retournent quand on les renverse. Parfois ils étendent les pattes arrière en convulsion. Ils ne mangent plus du tout.

Ensuite ils ne peuvent plus se redresser si on les met sur le dos et ils présentent encore quelques faibles tremblements.

Avec les larves jeunes le changement du comportement jusqu'au moment de la mort peut avoir lieu en quelques heures. Les derniers stades larvaires peuvent rester quelques jours sans bouger avant de mourir.

### 7.3. MORT DE L'INSECTE

Dans la littérature la cause de la mort n'est pas indiquée très précisément.

KODAIRA (1961) constatait que le filtrat d'une culture de *M. anisopliae* est toxique quand on l'injecte dans des larves de *Bombyx mori* L. Il trouvait quatre substances, toxiques pour le Ver à soie dans le filtrat: L-prolyl-L-leucine et L-prolyl-L-valine, d'une toxicité modérée et deux matières hautement toxiques qu'il appelait Destruixine A et B. Plus tard on a élucidé la structure de ces dernières toxines qui paraissent être des depsipeptides cycliques (SUZUKI et al., 1966).

ROBERTS (1966) a également examiné la toxicité des filtrats de culture de *M. anisopliae* vis-à-vis de *Galleria mellonella* L. et de *Bombyx mori* L. Il paraît

qu'en culture le champignon produit déjà des toxines avant la lyse des hyphes et il s'agit donc d'exotoxines. ROBERTS constatait également que le sang d'un Ver à soie, juste avant la mort due à *M. anisopliae* était toxique pour les larves de *Galleria mellonella* L.

Mais aucun de ces auteurs n'a prouvé d'une façon absolue que les 'Destruixines' du champignon sont présentes au moment de la mort dans l'insecte-hôte et qu'elles sont responsables de cette mort. Toutes ces toxines pourraient être des 'staling products' des cultures. Quand on pourrait isoler ces toxines d'un hôte moribond ou quand on serait capable de vérifier leur existence dans le sang à l'aide d'un antiserum, la cause de la mort de l'insecte-hôte serait déterminée avec plus de sûreté.

J'ai voulu vérifier si les filtrats de cultures immergées (Milieu Adamek, 1966) seraient également toxiques pour *S. gregaria*. Dans ce milieu le champignon forme des blastospores ce qui correspond plus avec ce qui se passe dans le corps de l'insecte. De plus j'ai voulu déterminer s'il y a des différences considérables entre les différentes souches quant à la production de toxines.

Les cultures immergées étaient produites dans des Erlenmeyers de 100 ml. avec 30 ml de milieu Adamek (voir 3.2.3.1.). Des essais préliminaires m'ont montré qu'il vaut mieux attendre la vingtième journée de la culture pour évaluer la toxicité. Quelques millilitres du milieu de culture étaient filtrés par filtre millipore pour en enlever les blastospores et les hyphes. Ces éléments généraient l'injection du filtrat aux insectes et pourraient également influencer le comportement après l'injection. Pour des raisons de comparaison j'ai injecté les filtrats stériles aux larves des derniers stades de *Galleria mellonella* L. aussi bien qu'aux larves du troisième stade de *S. gregaria*. Des criquets témoins étaient injectés d'avord avec le milieu Adamek dans lequel le champignon n'était pas inoculé. Ils étaient assez sensibles à ce milieu : on ne peut pas les injecter avec une quantité qui représente plus de 10 % de leur poids sans avoir des symptômes d'intoxication. Le pH du milieu ne semble pas jouer un rôle important quand il ne dépasse pas un pH de 7,2.

Pour les essais six larves de *Galleria* et six larves de *Schistocerca* étaient pesées et trois exemplaires de chaque espèce étaient injectées d'abord avec une quantité du milieu de culture filtré, correspondant à 5 % de leur poids, puis la même manipulation était répétée avec une dose correspondant à 10 % de leur poids. L'injection était faite avec une seringue à vis micrométrique AGLA et une aiguille fine (Hamilton N 731), ventralement dans l'abdomen entre le deuxième et le troisième segment pour les criquets et pour les larves de *Galleria* d'après la technique de Roberts.

Comme critère d'intoxication j'ai pris le pouvoir des larves de se retourner quand elles étaient mises sur le dos cinq minutes après l'injection.

Dans le tableau suivant quelques résultats des expérimentations sont donnés. Quand aucune des trois larves ne pouvait se redresser la toxicité était évaluée avec + ; quand au moins une des larves pouvait se redresser la toxicité était enregistrée comme  $\pm$  et quand tous les larves pouvaient se redresser cinq minu-



tes après l'injection le signe – était utilisé. Au moment de l'injection le pH du milieu était mesurée à l'aide du papier pH 'Lyphan'.

<i>M. anisopliae</i> no:	Réaction <i>Galleria</i> à injection:		Réaction <i>Schistocerca</i> à injection:		pH final du milieu:
	5 %	10 %	5 %	10 %	
2	±	±	+	+	6,6
3	—	±	—	—	6,6
5	—	±	—	+	7,2
6	±	±	±	±	6,6
7	±	+	+	+	7,2
14	—	±	—	+	6,6
17	±	+	±	±	6,6
19	+	+	+	+	6,9
24	±	±	±	+	7,2
25	—	±	±	+	6,9

Il se trouve que la production des toxines diffère chez les différentes souches de *M. anisopliae*. La sensibilité des deux insectes-tests ne paraît pas être la même pour les différents composants des toxines. Il ne semble pas qu'il y ait une corrélation entre l'intensité de la production des toxines d'une souche et sa virulence (voir 9.3.3.1).

Quant à la cause de la mort de *S. gregaria* infecté avec *M. anisopliae*: il me paraît fort probable que l'action des toxines provoque la mort. Tout d'abord parce que les symptômes d'intoxication après l'injection d'un filtrat de culture du champignon correspondent tout à fait avec les symptômes au moment de la mort après une infection à *M. anisopliae*, mais également parce que au moment de la mort l'invasion du corps par le champignon n'est que très peu avancée. Seulement peut-être dans le cas d'une infection orale où les centres nerveux sont rapidement atteints par les hypes, la croissance mycélienne et son action destructeur ne paraît pas être la raison principale de la mort de l'insecte.

## 8. SPORULATION

### 8.1. GÉNÉRALITÉS

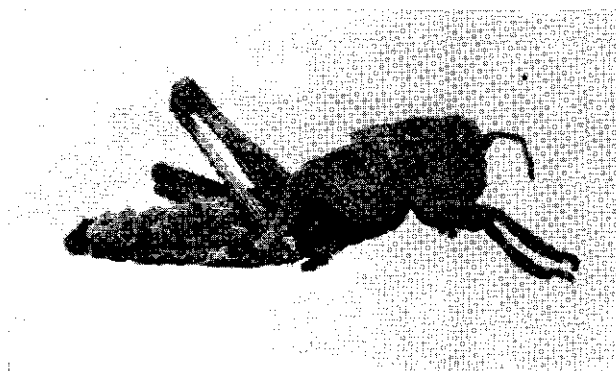
Après la mort de l'insecte infecté certaines souches de *M. anisopliae* commencent à se développer très rapidement. Les cadavres durcissent et perdent beaucoup d'eau quand l'atmosphère n'est pas saturée (KODAIRA, 1961). Les larves ne changent presque pas de couleur pendant ce processus. Les adultes deviennent plus ou moins rouge et peuvent prendre une teinte vineuse.

Sous des conditions optimales (température 27°C et dans une ambiance où l'air est saturé) le mycélium peut apparaître déjà un jour après la mort et surtout à des endroits où le tégument est mince, c.a.d. sur les membranes intersegmentaires et les articulations des pattes. Encore un jour plus tard, la sporulation peut commencer quand les conditions extérieures restent optimales. Finalement le mycélium peut couvrir le cadavre entièrement, sur ce mycélium se trouve alors partout une couche épaisse de spores (Photographie 11). Mais aussi dans le corps de l'insecte se forment des spores, sauf à la place du tube digestif.

Il est absolument nécessaire pour la formation des conidies que l'humidité relative soit près du point de rosée; à une humidité relative de 93 % par exemple le champignon ne sporule déjà plus sur le cadavre.

### 8.2. POUVOIR DE SPORULATION APRÈS LA MORT

J'ai essayé de me rendre compte si des conidies peuvent encore se former sur un cadavre qui pendant un certain temps a été conservé sous des conditions relativement défavorables pour le champignon. Une série de cadavres d'essais d'infection avec *M. anisopliae* par voie orale était maintenue à une température de 27°C et une humidité relative inférieure à 50 %. Chaque semaine trois momies étaient mises dans une atmosphère saturée où la température était de 27°C. Déjà trois semaines après il n'y avait plus une formation de conidies sur les cadavres. Il paraît probable que sous les conditions très variables sur le sol le champignon ne peut souvent plus déclencher une épizootie même quand après un



PHOTOGRAPHIE 11.  
Sporulation de  
*M. anisopliae* sur une larve  
de *S. gregaria*.  
Agrandissement  $\pm 3 \times$ .

délai relativement court les conditions de l'environnement deviennent favorables. Mais il me paraît possible que dans le sol le champignon peut former des conidies après plus longtemps, étant donné que là le cadavre risque moins de se dessécher complètement.

### 8.3. DIFFÉRENCES ENTRE LES SOUCHES

Quand on tue des criquets avec *M. anisopliae* on peut observer au moment de la mort des blastospores du champignon dans leur hémolymphe. Mais avec certaines souches, quand on laisse les cadavres sous des conditions favorables à la sporulation il se produit une putréfaction.

AHLBERG (1943) faisait les mêmes observations sur les larves de *Agrotis nigricans* L., d'après lui le développement du champignon dans le cadavre était empêché par la croissance de bactéries ce qui résultait en une absence de la sporulation de *M. anisopliae*.

SOROKIN (1883) constatait également, travaillant avec *Anisoplia austriaca* HBST. que quand la sporulation n'a pas lieu sur certain cadavres, obtenus après infection avec *M. anisopliae*, cela coïncide avec une putréfaction molle.

MORIMOTO (1959) isolait deux espèces de bactéries (bâtonnets, grampositives, aérobies) qui contaminaient des cultures de *M. anisopliae*. Ces bactéries montraient un fort pouvoir antibiotique et empêchaient la germination des conidies et la croissance des hyphes du champignon.

RUTGERS (1916) essayait d'infecter des larves du criquet *Cyrthacanthacris nigricornis* BURM. avec des conidiospores de *M. anisopliae*. Comme critère si le champignon était responsable de la mort il employait la sporulation sur le cadavre. Les essais faits à l'extérieur pendant un temps ensoleillé (pas trop humide?) montraient un pourcentage élevé de mortalité due à *M. anisopliae*. Un essai fait à l'extérieur dans une période de pluie constante ne montrait pas de mortalité due au champignon, la mortalité était pourtant totale après une semaine. Toutes les larves se putréfiaient.

J'ai constaté que certaines souches du champignon peuvent bien sporuler sur des cadavres sous des conditions favorables. Ces souches paraissent donc être plus adaptées à *S. gregaria* et ce sont évidemment seulement ces souches qui seraient capables de provoquer une épizootie dans la nature dans une population du criquet.

Pourtant quand on infecte des larves par saupoudrage du tégument avec une souche de *M. anisopliae* qui normalement sporule sur le cadavre et qu'on garde les larves dans une ambiance à humidité très élevée toutes les larves meurent mais se putréfient après la mort quoiqu'on puisse détecter des blastospores (parfois mélangées avec des bactéries) dans leur hémolymphe juste avant la mort. Dans une série témoin une faible mortalité, due à des infections bactériennes, pouvait être constatée.

Par contre quand on infecte par voie orale avec une forte dose de conidiospores de *M. anisopliae* et qu'on garde les larves à une humidité basse (en dessous de 50 %) toutes les larves meurent et seulement quelques-unes montrent

également des bactéries dans l'hémolymph. Ces larves se putrifient également, tandis que le champignon sporule sur les autres cadavres, placés sous des conditions favorables à la sporulation.

J'ai essayé d'expliquer la différence de comportement quant à la sporulation de diverses souches de *M. anisopliae*. Sans doute des bactéries peuvent envahir le corps d'un criquet du côté du tube digestif quand le criquet est affaibli. A ce moment, si les blastospores du champignon sont également présentes, commence une compétition entre *M. anisopliae* et les autres microorganismes qui déterminera la manifestation ou l'absence de sporulation.

J'ai essayé d'élever des larves de *S. gregaria* sous des conditions d'asepsie totale pour pouvoir infecter les larves avec des souches de *M. anisopliae* normalement non-sporulantes sur criquet. Ces essais ont échoué à cause d'infections secondaires.

J'ai traité la nourriture des larves avec de larges doses de chloramphénicol pour empêcher le développement des bactéries dans le tube digestif. Mais sur une larve ainsi nourrie, tuée par une souche non-sporulante du champignon la sporulation n'avait quand même pas lieu. On pourrait en déduire que certaines souches du champignon ne sont pas adaptées aux matières du criquet



PHOTOGRAPHIE 12.

Antagonisme entre une souche de *M. anisopliae* et *Aeromonas* sp.

pour réaliser leur croissance et leur sporulation. Toutes les souches du champignon sporulaient tout de même bien sur un agar préparé avec une décoction de larves du criquet.

Il est imaginable que dans la compétition entre le champignon et les bactéries envahissantes, des antibiotiques pourraient jouer un rôle et que les souches non-sporulantes du champignon ont un pouvoir antibiotique inférieur à celui des souches sporulantes. KODAIRA (1961) trouvait un léger pouvoir antibiotique de *M. anisopliae* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (TERAJIMA) en cultivant le champignon sur un agar glucose-bouillon à 28 °C. J'ai répété ces essais avec deux souches sporulantes et deux souches non-sporulantes de *M. anisopliae*. Les boîtes de Pétri avec l'agar nutritive (pH 7,0) étaient inoculées avec ces souches en forme de strie ('agar streak method' de Kodaira). Après six jours les boîtes étaient inondées avec une suspension peu concentrée de *Staphylococcus aureus*. Les résultats étaient entièrement négatifs: on ne constatait pas d'inhibition des bactéries.

J'ai également fait une série d'isolements de bactéries en faisant un frottis sur un agar nutritif de l'hémolymph des criquets préalablement saupoudrés avec des conidiospores du champignon et placés sous des conditions d'humidité élevée. Au moins une espèce de ces bactéries (*Aeromonas* sp.), gênait la croissance du champignon sur un Sabouraud de conservation (Photographie 12). In vitro la sporulation du champignon n'avait pas lieu au voisinage de la colonie bactérienne.

## 9. ESSAIS DE DOSAGE

### 9.1. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

La virulence, la mesure du pouvoir pathogène, peut être exprimée par la  $DL_{50}$ , c.a.d. par la dose d'éléments d'un pathogène nécessaire pour tuer 50 % d'une population. De cette façon on peut comparer par rapport à la virulence plusieurs pathogènes différentes aussi bien que différentes souches de la même pathogène toujours vis-à-vis du même stade d'un insecte-hôte. En principe on peut envisager la mesure en appliquant les différentes doses de la pathogène par voie percutanée ou perorale ou en les injectant.

La littérature concernant les essais de dosage avec *M. anisopliae* est peu abondante et souvent vague.

GETZIN (1961) comparait la virulence de plusieurs champignons entomopathogènes vis-à-vis des larves de *Trichoplusia ni* (HÜBNER). L'application des spores était percutanée. Il remarquait une différence de virulence entre deux souches de *M. anisopliae* pour les néonates de cet insecte.

LATCH (1965) communiquait que la virulence de différents isolaments de *M. anisopliae* venant de plusieurs insectes de prairie différait considérablement toujours vis-à-vis d'un de ces insectes. Il indiquait que l'isolament du champignon à partir d'un de ces insectes était toujours le plus virulent justement pour cet insecte. Il paraît donc exister une certaine adaptation d'isolaments de *M. anisopliae* ne permettant cependant pas de parler de races physiologiques et certainement pas de formae speciales. Les dosages étaient effectués par saupoudrage des larves ou en mélangeant des cultures du champignon avec le sol utilisé pour l'élevage des larves. Les résultats des deux séries d'essais étaient comparables. Contrairement aux indications de GETZIN, LATCH ne donne ni le nombre de larves utilisées, ni le stade de ces larves au début du test.

MASERA (1957), travaillant avec *Bombyx mori* L., administrait une dose de spores préservées pendant cinq mois et une dose de spores préservées pendant un mois. Il dosait par voie orale. Seulement dans le groupe des larves traitées aux spores jeunes le champignon tuait 53,7 % des bêtes. Malheureusement MASERA ne précise pas de combien de spores il s'agit.

Une analyse où le logarithme de la dose et les 'probits' annexes sont utilisés pour déterminer la  $DL_{50}$  d'une souche de *M. anisopliae* vis-à-vis de *Drosophila* était effectuée par ROBERTS (1964). Il employait une suspension de conidiospores de *M. anisopliae* qui était mise sur un agar de sucrose placé en boîtes de Pétri. Les *Drosophiles* utilisées étaient des adultes aptères. ROBERTS ne comparait pas des souches différentes de *M. anisopliae*. Il paraît très probable que les conidiospores germaient sur l'agar utilisé. Il n'est donc pas sûr que l'infection était provoquée par des tubes germinatifs des conidiospores. L'infection pourrait avoir été provoquée par le mycélium se développant sur l'agar, ce qui influencerait évidemment la valeur absolue de la  $DL_{50}$ .

SCHAERFFENBERG (1959) comparait l'action d'une souche de *M. anisopliae* vis-à-vis des larves de *Leptinotarsa decemlineata* SAY et des adultes de *Musca*

*domestica* L. à des températures différentes. Mais il n'indique ni la dose du champignon utilisée par larve ni le nombre de larves utilisées.

## 9.2. L'ÉLEVAGE DES CRIQUETS

L'élevage des criquets était effectué dans une chambre semi-climatisée. La température était réglée à environ 30 °C, l'humidité relative était approximativement 70 %. La longueur d'éclairage était 17 heures. Dans la chambre les cages pour les stades larvaires n'étaient pas chauffées par une lampe infra-rouge sauf la cage pour le dernier (cinquième) stade larvaire où les  $L_5$  étaient mises pour muer en imago. Après elles étaient mises dans les cages de ponte, là aussi il y avait des lampes qui ne chauffaient que dans la période d'éclairage de façon à produire une différence de température entre le jour et la nuit (HUNTER-JONES, 1956). La nourriture des criquets consistait en salade, des choux, des jeunes pousses de blé, des feuilles de *Glyceria fluitans* R.Br. et du son. L'élevage ne présentait pratiquement pas de maladies; j'ai constaté parfois une mortalité peu importante due à *Aspergillus flavus* LINK et une fois dans une cage un grand nombre de larves mouraient à la suite d'une infection bactérienne provoquée par *Serratia marcescens* BIZIO. Pour avoir un nombre de jeunes larves éclosant au même moment j'ai parfois mis des oeufs à des températures en dessous de 30 °C pour freiner le développement des embryons. Pour avoir un certain nombre de larves, par exemple du deuxième stade muant ensemble en 12 heures il faut avoir au moins le double de larves du premier stade éclosant approximativement au même moment. Pour les essais de dosage je n'ai utilisé que les larves provenant de femelles jeunes (ayant un âge maximum de quatre semaines après la mue imaginale). Quand on utilise des larves provenant de femelles plus âgées on risque d'avoir une mortalité importante dans les séries témoins qui peut facilement dépasser 20 %.

## 9.3. TECHNIQUE ET RÉSULTATS DES DOSAGES

### 9.3.1. Production de l'inoculum

Pour standardiser la qualité de l'inoculum j'ai toujours utilisé la même quantité du même milieu de culture (Sabouraud de conservation) dans le même type de tubes de culture. Mais les pourcentages de germination (méthode Müller-Kögler, avec comme milieu un Sabouraud maltosé) variaient considérablement. Le facteur qui apparemment influençait ce pourcentage de germination est l'humidité relative dans les tubes de culture. Pour cette raison j'ai mis mes tubes de culture après l'ensemencement dans une cloche bien fermée dans laquelle l'humidité relative était réglée par le nitrate de potassium, qui, à une température de 27 °C donne une humidité relative entre 90 et 92 %. De cette façon les spores gardent bien leur pouvoir germinatif, même après un mois le pourcentage de germination atteignait encore au moins 90 % sur le Sabouraud maltosé. J'ai également utilisé des conidiospores provenant de cultures de riz bouilli, stérile (3.2.3.2.). Ces conidiospores gardent bien leur pouvoir germinatif

quand on les laisse dans un réfrigérateur (à + 4°C), dans le noir, sous le gaz carbonique. Même 30 jours après la récolte le pourcentage de germination ne différait pas du pourcentage de germination des spores qui venaient d'être formées sur tube.

### 9.3.2. *Essais avec des larves du premier stade*

Pour ces essais j'ai pulvérisé la nourriture (blé germé et chou) avec une suspension de conidiospores provenant directement d'un milieu de culture consistant de riz bouilli, stérile. Pour bien mouiller les plantes la suspension était faite dans une solution 0,1 % de Tween 80 dans de l'eau du robinet. A cette faible concentration le Tween ne gêne pas la germination des spores, les larves supportent également bien cette dose. Après le traitement les plantes et les larves étaient mises dans de petites cages qui, à leur tour étaient placées dans une étuve bien ventilée où l'humidité relative restait en dessous de 50 % et où la température était 28,5°C. Il y avait trois doses de spores: 0,5; 0,05; et 0,005 %; la série témoin était seulement traitée au Tween 80. La nourriture infectée et la nourriture traitée seulement au Tween 80 restait trois jours dans les cages, dès le troisième jour les larves obtenaient chaque jour de la nourriture fraîche à manger. Par dose il y avait environ 40 larves qui étaient utilisées dans les six heures suivant l'éclosion. Avec les doses 0,5 et 0,05 % toutes les larves mouraient au premier stade. Avec la dose 0,005 % la majorité des larves mouraient au premier stade. La mortalité témoin était 8,8 %.

Quand on traite des larves d'un certain stade il peut y avoir de la mortalité pendant ce même stade et le suivant, mais je n'ai constaté de la mortalité due au champignon que très rarement encore un stade plus tard.

Les résultats de cet essai sont insérés dans la figure 3.

### 9.3.3. *Essais avec des larves du deuxième stade*

Pour ces essais des larves, mises à jeûner pendant huit heures environ directement après la mue étaient traitées individuellement. Des conidiospores de la souche *M. anisopliae* no. 9, provenant d'une culture en tube sur du Sabouraud de conservation (9.3.1.) qui avait un âge de 12 jours, étaient mises dans 5 ml d'eau du robinet et homogénéisées pendant quatre minutes à l'aide d'un homogénéisateur (Type Potter et Elvehjem). La concentration de la suspension était déterminée après dilution 1 : 50 avec un hématimètre d'après Bürker-Türk. La suspension était délivrée à l'aide d'un microséringue AGLA et une vis micrométrique sur des feuilles de *Poa annua* L., préalablement humidifiées avec une solution de Tween 80 (0,1 %), et dont leur base trempait dans l'eau. Après avoir déposé chaque goutte de suspension j'ai agité la seringue, qui contenait quelques billes de verre, pour que la suspension reste bien homogène. On peut faire sécher les gouttes rapidement en utilisant un ventilateur électrique. Les feuilles étaient pliées à la place de la gouttelette, le 'sandwich' était mis dans une pince-crocodile et cette pince était mise à travers un petit bouchon. Les larves étaient ensuite mises dans de petites tubes de 5 cm de long, ayant un diamètre de 15 mm; ces tubes étaient fermées avec le bouchon à la pince-croco-



FIG. 3. Essai de dosage avec des conidiospores de *M. anisopliae* no. 17 sur des larves du premier stade de *S. gregaria*. Pulvérisation.

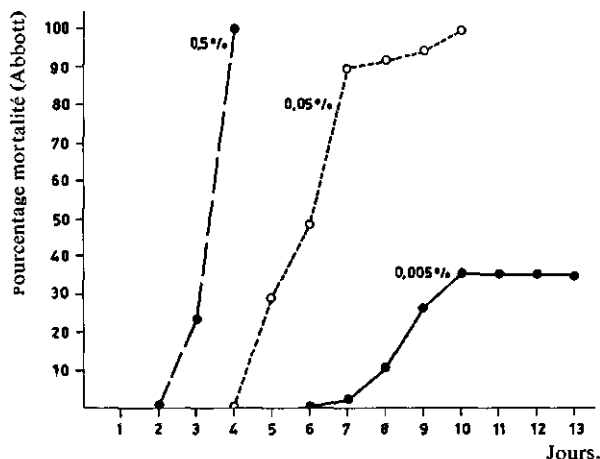
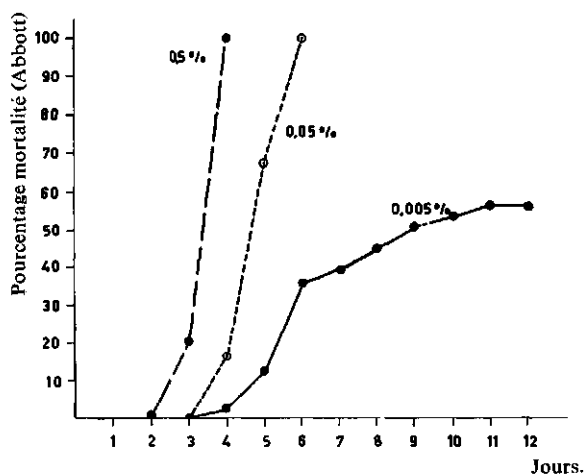


FIG. 4. Essai de dosage avec des conidiospores de *M. anisopliae* no 17 sur des larves du deuxième stade de *S. gregaria*. Pulvérisation.

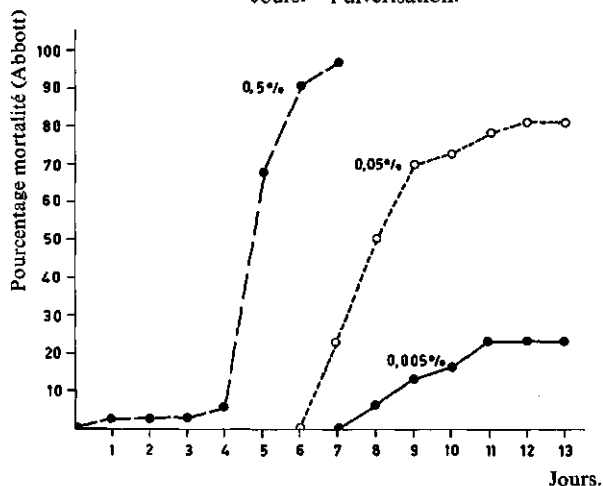
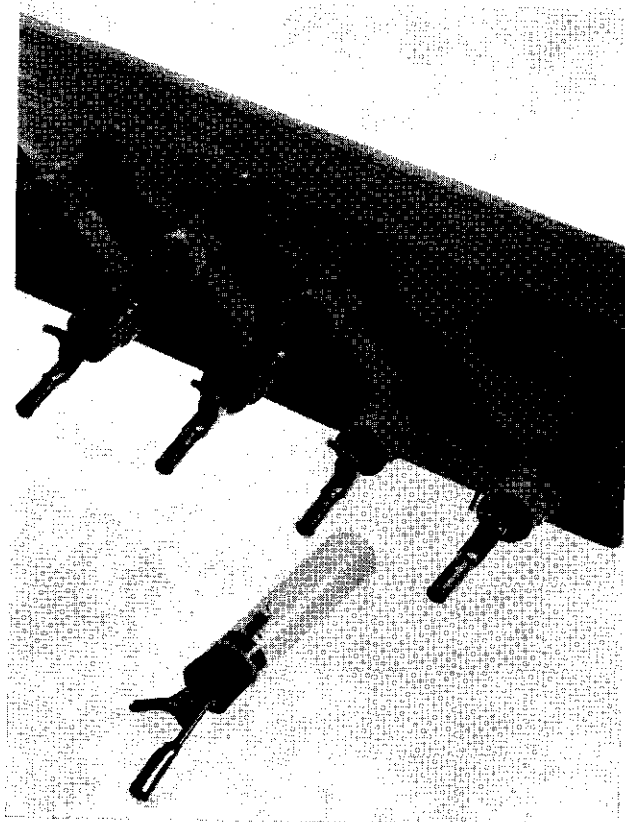


FIG. 5. Essai de dosage avec des conidiospores de *M. anisopliae* no. 17 sur des larves du troisième stade de *S. gregaria*. Pulvérisation.

dile. Il faut garder les larves à une température élevée, un choc de température leur fait perdre leur appétit pour longtemps. Ensuite les tubes étaient mis dans des dispositifs qui les laissaient dans une position légèrement inclinée (Photographie 13). Les tubes étaient aux trois quarts enfoncés dans ce dispositif, ainsi les larves, attirées par la lumière et guidées par leur géotropisme négatif, trouvaient facilement leur nourriture. Quand on utilise des tubes plus larges les larves ne trouvent pas ou très difficilement la feuille. Généralement 80–90 % des larves mangeaient leur feuille en quatre heures. Ensuite elles étaient mises dans des petites cages dont les côtés consistaient en toile métallique. Ces cages étaient placées dans une étuve bien ventilée à une température de 28,5 °C où l'humidité relative restait en dessous de 50 %. Quand l'humidité relative monte au dessus de 70 % on risque d'avoir une mortalité importante, due à *Aspergillus flavus* LINK, une température en dessous de 28 °C est également défavorable pour la santé des larves. Chaque jour la nourriture des larves était renouvelée, les cages étaient nettoyées et les larves mortes enlevées. Il y avait quatre séries de larves par essai qui étaient traitées avec des spores et une série témoin. Il y avait 35–40 larves par série. L'essai était répété une fois.



PHOTOGRAPHIE 13.  
Dispositif pour des essais  
de dosage.

La mortalité commençait au quatrième jour, la mue  $L_2-L_3$  se passait au 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jour. La mortalité due au champignon continuait encore au troisième stade. L'essai était terminé au moment où les larves muaient de  $L_3-L_4$  (13<sup>e</sup> jour). La mortalité pendant cette mue n'était donc pas comptée. Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau suivant et, après correction d'après Abbott et transformation en probits de la mortalité (Bliss) mis en graphique.

Essai I				Essai II			
Dose	Mortalité	Mort. (%)	Mort. (% Abbott)	Dose	Mortalité	Mort. (%)	Mort. (% Abbott)
Tem.	2 sur 35	5		Tem.	0 sur 35	0	
60625	13 sur 38	34	30	66640	4 sur 35	12	12
121250	17 sur 35	48	45	133280	11 sur 36	30	30
181875	20 sur 40	50	46	199920	21 sur 34	61	61
242510	27 sur 39	69	67	266560	17 sur 34	50	50

La direction de la ligne droite était obtenue par calcul. On obtient une estimation de la  $DL_{50}$  pour chaque essai en comparaisant les deux droites dans la graphique. Les  $DL_{50}$  des deux essais étaient également calculées avec leur variation: pour le premier essai la  $DL_{50}$  se trouve entre 64000 et 337000 spores (estimation: 150000) et pour le deuxième essai la  $DL_{50}$  se trouve entre 160000 et 275000 spores (estimation: 210000). Paradoxalement les résultats des essais

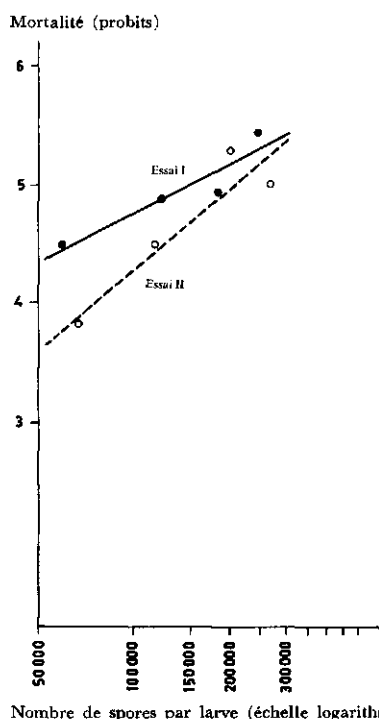


FIG. 6. Essai de dosage avec des conidio-spores de *M. anisopliae* no. 9 sur des larves du deuxième stade de *S. gregaria*. Méthode 'sandwich'.

dans le temps paraissent être plus comparables (pas de différence significative entre les  $DL_{50}$  des deux essais) quand la méthode d'estimation devient moins bonne (moins de séries par essai). Il me paraît dangereux de comparer les résultats des essais dans le temps.

BUCHER (1956) a comparé les inclinaisons des droites (log dosis – probit) d'une série de pathogènes d'insectes (entre autres *Bacillus thuringiensis* BERLINER) avec quelques insecticides. Les inclinaisons des lignes droites des pathogènes d'insectes étaient faibles, c.a.d. qu'une augmentation importante de la dose d'un pathogène ne se traduisait que par un faible accroissement de la mortalité sauf pour *Bacillus thuringiensis*. BUCHER exprime les inclinaisons des lignes droites par le changement du valeur de l'ordonnée en probits comme résultat d'une augmentation de la dose de dix fois. Il me paraît douteux de pouvoir comparer des insecticides avec des pathogènes d'insectes, le processus d'infection d'un pathogène ne me semble pas comparable avec la pénétration d'un insecticide, mais, quoi qu'il en soit, on peut comparer de cette façon les pathogènes d'insectes entre eux. Pour *M. anisopliae* no. 9 les deux inclinaisons étaient calculées, elles étaient respectivement 1,4 et 2,3, c.a.d. qu'elles sont comparables à *Bacillus thuringiensis* Berliner. Quand l'inclinaison de la ligne est faible il sera difficile de comparer deux souches du même pathogène parce que les limites de fidélité de chaque ligne risquent beaucoup de se toucher. La valeur de la  $DL_{50}$  ne sera que très relative.

#### 9.3.3.1. Comparaison de différentes souches

Pour ces essais quelques souches différentes de *M. anisopliae* étaient utilisées sur des lots d'environ 35 larves (9.3.3.). La dose utilisée de chaque souche était 150000 spores. Les séries témoins consistaient également d'environ 35 larves, la mortalité dans ces séries était toujours inférieur de 15 %. Etant donné que la sensibilité des larves peut différer dans le temps on ne peut que comparer les résultats dans un essai et pas des essais différents. Mais les résultats totaux de tous ces essais donnent quand-même une impression, quoique assez grossière de la virulence de ces quelques souches, c.a.d. qu'on peut en déduire la notion relative des meilleures souches qui seraient éventuellement utilisables pour la pratique dans le cas d'une application pour la lutte biologique.

Dans la figure 7 les mortalités finales (en pourcentage corrigé d'après Abbott) des quatre essais sont données. Les mortalités témoins correspondantes sont données en bas du graphique. En bas du graphique est indiqué également si les différences dans un essai sont significatives ( $P < 0,05$ ). Les différentes souches de *M. anisopliae* sont numérotées (voir 3.1.).

Les souches *M. anisopliae* no. 8 et 9 sont identiques d'origine, seulement la souche 9 est obtenue après une passage de la souche 8 par *S. gregaria*. La virulence a augmentée considérablement après cette seule passage mais la différence n'est pas significative (teste  $\chi^2$ ).

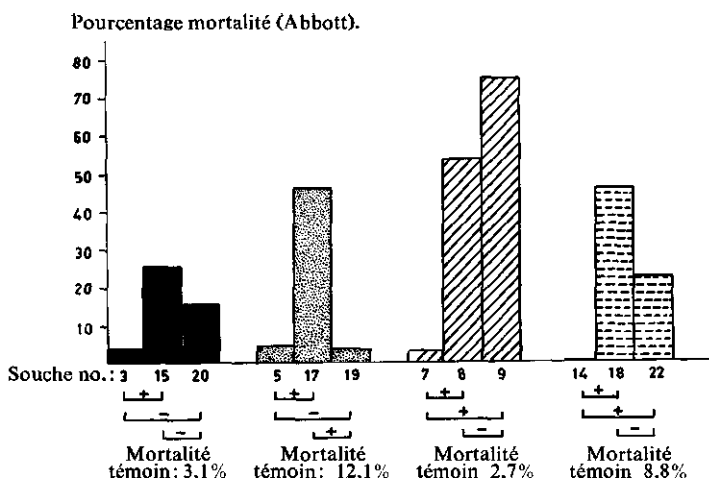


FIG. 7. Résultats de quatre essais pour comparer la virulence de douze souches de *M. anisopliae*. Méthode 'sandwich', dose  $\pm$  150000 spores.

### 9.3.3.2. Influence du poids

L'activité d'un insecticide peut être exprimé par le nombre de grammes de l'insecticide par gramme de poids de l'insecte nécessaire pour tuer ce même insecte. Quant aux pathogènes d'insecte je n'ai pas pu trouver des indications dans la littérature que la sensibilité d'un insecte vis-à-vis d'une certaine quantité d'un pathogène présente quelque relation avec le poids de cet insecte. Il est néanmoins bien connu que dans une population d'insectes les individus les plus petits sont souvent les plus faibles aussi. J'ai seulement fait un essai introductif avec des larves du deuxième stade qui venaient de muer et qui, ensuite, étaient laissées à jeûne pendant 6 heures. Elles étaient narcotisées à l'aide du gaz carbonique et pesées. Les larves qui pesaient moins que 40 milligrammes et celles qui pesaient plus de 50 milligrammes étaient utilisées pour cet essai. Il était offert  $\pm$  170000 spores (9.3.3.) aux larves des deux séries. Après 17 jours les larves qui n'étaient pas mortes à cause du traitement étaient tous devenues L<sub>4</sub>. Les mortalités à ce moment sont indiquées dans la table suivante:

	Mortalité	Mortalité en %	Mortalité en % (Abbott)
Larves lourdes traitées:	23 sur 31	74	71
Larves lourdes témoins:	3 sur 29	10	
Larves légères traitées:	26 sur 27	96	95
Larves légères témoins:	7 sur 24	29	

Avec un test  $\chi^2$  après correction de continuité il paraît que la différence entre les mortalités des larves lourdes et des larves légères est significative ( $P < 0,05$ ). Il faut tout de même considérer la valeur de ce seul essai avec beaucoup de prudence.

#### 9.3.3.3. Pulvérisation aqueuse sur la nourriture

Pour ces essais j'ai traité la nourriture avec une suspension de conidiospores provenant d'un milieu de culture consistant de riz bouilli, stérile. Ces spores étaient les mêmes que celles utilisées pour l'essai décrit en 9.3.2., elles étaient gardées dans un réfrigérateur à 4°C, dans le noir et sous le gaz carbonique. La seule différence avec l'essai décrit en 9.3.2. était que les larves utilisées étaient des larves du deuxième stade. La mortalité dans la série témoin était 7.5 %. Les résultats de cet essai sont insérés dans la figure 4.

#### 9.3.3.4. Essais d'infection avec des blastospores

Pour cet essai avec des larves du deuxième stade j'ai suivi la méthode décrite en 9.3.3. Les blastospores, produites en milieu Adamek étaient utilisées le quatrième jour après l'ensemencement des Erlenmeyers.

Il y avait trois séries de larves traitées à la méthode 'sandwich' avec des blastospores des souches *M. anisopliae* no.s 9, 17 et 18, les souches les plus virulentes. Les doses utilisées étaient très élevées pour pouvoir se rendre compte si c'est vraiment possible d'infecter des larves avec des blastospores. Il y avait deux séries témoins: une série où les sandwiches n'étaient pas traités du tout et une série où les sandwiches étaient traités avec une quantité du milieu Adamek non-inoculé, correspondante avec la quantité dans les séries traitées avec le milieu Adamek aux blastospores. Toutes les cinq séries comprenaient 40 larves. Dans les séries où il y avait des sandwiches traités aux blastospores les larves ne voulaient parfois pas du tout manger. Très souvent elles consommaient leur sandwich laissant de côté le petit bout avec le milieu. Les différences entre les nombres des larves qui avaient mangées leur feuille dans les séries traitées aux blastospores et les nombres des larves des séries témoins étaient significatives.

Apparemment il y a des matières répulsives dans le milieu Adamek inoculé avec le champignon qui inhibent l'appétit des larves. Ces observations correspondent avec les données de KODAIRA (1961), qui constatait une action répulsive des deux toxines Destruxine A et B, produites par *M. anisopliae* vis-à-vis des larves d'*Epilachna sparsa* HERBST. Il est fort bien possible que ces toxines étaient également présentes dans le milieu Adamek inoculé avec les diverses souches de *M. anisopliae*. Dans le tableau suivant sont insérés les résultats de cet essai:

Traitement des sandwiches	Nombre blastospores	Nombre de larves ayant mangées	Mort. en % (Abbott)
Milieu Adamek inoculé avec <i>M. anisopliae</i> no. 9	$1,1 \times 10^6$	11	23,6
Milieu Adamek inoculé avec <i>M. anisopliae</i> no. 17	$6,9 \times 10^6$	18	76,6
Milieu Adamek inoculé avec <i>M. anisopliae</i> no. 18	$1,0 \times 10^6$	14	65,0
Milieu Adamek non-inoculé	—	28	
Sans milieu	—	39	

Les larves mortes dans les séries au Milieu Adamek inoculé étaient mises dans des boîtes de Pétri munies de morceaux de coton humide. A une température de 28°C le champignon sporulait sur presque tous les cadavres; apparemment on peut donc provoquer la maladie à l'aide des blastospores de *M. anisopliae*.

#### 9.3.4. *Essais avec des larves du troisième stade, pulvérisation aqueuse sur la nourriture*

Pour ces essais j'ai traité la nourriture avec une suspension de conidiospores provenant d'un milieu de culture consistant de riz bouilli, stérile. Ces spores étaient les mêmes que celles utilisées pour les essais, décrits en 9.3.2. et 9.3.3.3. Par série il y avait 35 larves du troisième stade qui venaient de muer. J'ai diminué le nombre de larves pour avoir moins de risque de cannibalisme parmi les larves. La mortalité dans la série témoin était 8,3 %. Les résultats de cet essai sont insérés dans la figure 5.

Quoique les résultats des essais faits à des temps différents ne soient pas entièrement comparables, on obtient quand-même une notion des différences de sensibilité des trois premiers stades larvaires [p. 53].

Il semble que la sensibilité diminue légèrement avec l'âge, le temps d'incubation de la maladie semble devenir plus longue lorsque les larves sont plus âgées.

## 10. RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

### 10.1. RÉSUMÉ

#### 10.1.1. Introduction

Ce chapitre consiste en une discussion générale sur l'état de nos connaissances concernant les champignons entomopathogènes de la Classe des *Deuteromycetes*. L'accent est mis principalement sur les nombreux problèmes fondamentaux et sur les lacunes des observations scientifiques.

#### 10.1.2. Nomenclature

D'après une étude bibliographique, il apparait que les trois espèces précédemment décrites, *Metarrhizium brunneum* PETCH, *Metarrhizium album* PETCH et *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN sont, avec une forte probabilité, indentiques.

Les quatorze souches isolées se divisent en deux groupes suivant la longueur des conidies, en accord avec les observations de JOHNSTON (1915), qui distingue une 'forma major' et une 'forma minor'.

Etant donné qu'il n'existe pas de matériel type de *M. anisopliae* dans les herbiers, un néotype a été créé et déposé au Centraal Bureau voor Schimmelcultures à Baarn (Pays-Bas).

#### 10.1.3. Isolement, développement et croissance, conservation

*M. anisopliae* a été isolé de quatorze espèces d'insectes soit sur le milieu de Sabouraud de conservation, soit sur un milieu gélosé à l'extrait de cerise, le milieu de MARTIN (1950) ou encore un milieu spécial d'isolement (VEEN et FERRON, 1966) à base d'actidione (cycloheximide) et de chloramphénicol limitant le développement des bactéries et des champignons contaminants.

En culture flottante, le champignon sporule particulièrement bien lorsque le milieu est à base de peptone Chapoteaut. La production de masse des conidiospores a été obtenu sur des graines de riz bouillies et stérilisées. Le développement des blastospores en culture agitée, suivant la technique d'ADAMEK (1967), a été contrôlé sur dix souches (5 forma major et 5 forma minor). Généralement la concentration en blastospores, après 96 heures de culture, est de l'ordre de  $10^8$  à  $10^9$  par ml, mais une souche n'en a développé qu'un faible nombre.

La conservation des souches a été obtenu, avec succès, par culture sur jaune d'oeuf coagulé à 80°C et maintien au réfrigérateur à +4°C. De cette façon la conservation est assurée pendant au moins 20 mois. La lyophilisation de suspensions de conidiospores dans du lait écrémé a également permis de conserver des spores viables pendant 6 mois.

#### 10.1.4. Liste d'hôtes

D'après une analyse aussi complète que possible de la bibliographie, 204 espèces d'insectes, et principalement des *Coleoptera* ont été reconnues sensibles à la mycose à *M. anisopliae* dans les conditions naturelles. Il est à remarquer



que parmi les *Coleoptera* il s'agit surtout d'insectes terrestres ou souterrains.

#### 10.1.5. Germination et développement des tubes germinatifs

Les conidiospores de *M. anisopliae* ne germent qu'en présence d'eau liquide. A l'exception des zones intersegmentaires où les replis du tégument ne permettent pas de faire des observations directes, la transpiration de l'insecte (*Schistocerca gregaria* FORSK.) ne semble pas influencer la germination des conidiospores sur les surfaces libres du tégument. Il a été constaté que les lipides épicuticulaires des larves du cinquième stade peuvent influencer positivement la germination des conidies, contrairement à la cire des abeilles. La composition du milieu de culture, utilisé pour la production des conidiospores, peut également avoir une influence très importante sur la germination des spores déposées sur un extrait des lipides épicuticulaires du criquet, mais les différentes souches de *M. anisopliae* se comportent différemment. In vivo et in vitro, le champignon développe, après la germination, des structures analogues aux 'appressoria'. Cependant il ne se forme que rarement des tubes de pénétration sous les 'appressoria' in vitro et parfois même les appressoria ne sont pas indispensables à la croissance de ces tubes de pénétration.

#### 10.1.6. Pénétration et infection

Des coupes histologiques ont montré que l'infection des larves de criquet du deuxième stade par des conidies d'une souche de *M. anisopliae* elle-même isolée de *S. gregaria* se produit après un délai d'environ 90 heures. La pénétration des hyphes a lieu dans la cavité buccale et principalement dans la partie proximale des palpes maxillaires. Dans ces conditions l'humidité relative de l'air dans lequel les larves sont placées ne joue aucun rôle pendant le processus d'infection. Par contre il est nécessaire que le point de rosée soit atteint pour la pénétration du mycélium à travers le tégument externe. Il a été observé, sur des larves du troisième stade, que le champignon ne pénètre pas préférentiellement dans des sites déterminés comme par exemple les membranes intersegmentaires. En principe la pénétration peut avoir lieu à n'importe quel endroit du tégument. Des observations indiquent que le processus de la pénétration s'accompagne d'actions enzymatiques et mécaniques. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une action phagocytaire des hémocytes après la pénétration.

Des injections de conidiospores dans le rectum ont été également réalisées et ont montré que l'infection peut être également obtenue de cette manière mais dans l'hypothèse d'une contamination orale cette éventualité n'a vraisemblablement que peu d'importance. La formation des blastospores a lieu probablement aux endroits où le mycélium ayant traversé le tégument et l'épiderme entre en contact avec l'hémolymph en mouvement.

#### 10.1.7. La dernière phase de la maladie

La mort de l'insecte peut se produire même s'il n'y a que relativement peu de matériel fongique dans le corps. Cette observation, ainsi que le comportement anormal de l'insecte juste avant la mort, permet de penser à l'action de toxines.

C'est pourquoi la toxicité de filtrats de culture de dix souches de *M. anisopliae* a été contrôlée sur des larves de *Galleria mellonella* L. et de *S. gregaria*. On a aussi constaté de grandes différences d'activité suivant les souches. Il n'a pas pu être établi qu'il y a une corrélation entre la production de toxines et la virulence élevée d'une souche pour les larves de *S. gregaria*.

#### 10.1.8. *Sporulation*

Lorsque des larves de criquet sont placées dans une atmosphère où l'humidité relative de l'air est très élevée, il se développe parfois des infections bactériennes qui peuvent provoquer une certaine mortalité. Dans ces conditions défavorables l'état physiologique de l'insecte est donc altéré. Au début d'une infection à *M. anisopliae* on constate également un affaiblissement de l'hôte et, même avant la mort, on peut observer simultanément des blastospores et des bactéries dans l'hémolymph. En conséquence une compétition s'établit entre ces microorganismes après la mort de l'insecte. Dans ces conditions théoriquement optimales pour le développement du champignon, la sporulation n'a pas lieu quoique il y ait des différences entre les souches.

Il a d'ailleurs été constaté, in vitro, sur des cultures en boîte de Pétri sur milieu de Sabouraud de conservation, un ralentissement du développement du champignon au voisinage des cultures bactériennes (surtout *Aeromonas* sp). Lorsqu'il y a très peu de bactéries, la sporulation sur les cadavres d'insectes ne se produit que si l'humidité relative est extrêmement élevée; ainsi à 93 % H.R. la sporulation ne se produit pas.

#### 10.1.9. *Essais de dosage*

Des expériences de dosage de la quantité de spores nécessaires pour provoquer la mort des larves de criquet du deuxième stade ont montré des différences d'activité importantes entre les douze souches étudiées. Une estimation de la  $DL_{50}$  a été faite avec une souche isolée de *Polyphylla olivieri* CAST. et il a été constaté que la pente de la droite logarithme de la dose-mortalité probit est très forte et présente des analogies avec la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* BERLINER. Simultanément des expériences analogues ont été réalisées en contaminant la nourriture des criquets à l'aide d'une suspension de spores pulvérisée. Ces essais ont été effectués sur des larves du premier, second et troisième stade. Il semble que la sensibilité des criquets à la mycose ne diminue que légèrement en fonction de l'âge des larves mais par contre l'incubation de la maladie est plus longue lorsque les larves sont plus âgées. Il est également possible d'effectuer avec succès des expériences de dosage par voie orale à l'aide de blastospores obtenues en culture profonde.

### 10.2. CONCLUSIONS

Si, dans le passé, l'emploi de préparations biologiques insecticides à base de *M. anisopliae* (METSCH.) SOR. (*Fungi Imperfecti*), dans la lutte contre les insectes ravageurs des cultures, n'a pas donné de résultats très satisfaisants, il appa-

rait, à la suite des recherches effectuées que des perspectives très positives s'ouvrent pour détruire le Criquet pèlerin, *S. gregaria* (Forsk.) et surtout les larves des deux premiers stades. Du fait que l'infection de ces insectes par la cavité buccale a été démontrée, il est possible de provoquer le développement de la mycose même dans des conditions d'humidité relative très basse ce qui est fréquemment le cas dans les biotopes où vivent ces insectes. Il semble cependant que les possibilités de déclencher des épizooties soient limitées, car pour obtenir la sporulation du champignon, indispensable à la propagation de la maladie, il est nécessaire que l'humidité relative de l'air soit très élevée.

En étudiant les conditions d'infection d'autres insectes par *M. anisopliae* pour vérifier les possibilités plus générales d'infection par voie orale et en précisant les quantités de spores nécessaires pour provoquer une mortalité élevée dans les meilleurs délais, il sera possible de définir les conditions d'emploi de ce moyen de lutte biologique d'une manière plus précise.

Evidemment il sera indispensable d'accorder une place déterminante à la technologie et à la rentabilité de la production en masse de ce champignon en raison des incidences économiques de la multiplication de tels traitements. Des recherches de base devront se développer pour permettre la sélection des souches de champignon les plus virulentes, et pour conserver et augmenter leur pouvoir infectieux par divers moyens physiques et chimiques. La spécificité des souches vis-à-vis des insectes nuisibles et utiles et leur activité éventuelle sur les vertébrés, quoique très peu probable d'après la littérature, doivent également retenir notre attention.

## 11. SAMENVATTING EN KONKLUSIES

### 11.1. SAMENVATTING

#### 11.1.1. Inleiding

Dit hoofdstuk bevat een algemene bespreking van wat bekend is over de insektendodende schimmels van de klasse der Deuteromycetes. De nadruk wordt vooral gelegd op de vele fundamentele problemen en op de leemten in de wetenschappelijke waarnemingen.

#### 11.1.2. Nomenclatuur

Uit een bibliografische studie blijkt, dat *Metarrhizium brunneum* PETCH, *Metarrhizium album* PETCH en *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN zeer waarschijnlijk identiek zijn. De veertien geïsoleerde stammen van *M. anisopliae* kunnen volgens de lengte der conidiën in twee groepen verdeeld worden, hetgeen in overeenstemming is met de waarnemingen van JOHNSTON (1915), die een 'forma major' en een 'forma minor' onderscheidde. Aangezien er geen type-materiaal van *M. anisopliae* in de collecties aanwezig is, is er een neotype vastgesteld en bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn (Nederland) gedeponeerd.

#### 11.1.3. Isolatie, ontwikkeling en groei, bewaring

Conidiosporen van *M. anisopliae* werden van veertien insectensoorten geïsoleerd en geënt op een voedingsbodem volgens Sabouraud, op kers agar, op een voedingsbodem volgens MARTIN (1950) of wel op een speciaal isolatiemedium (VEEN en FERRON, 1966), waaraan actidione (cycloheximide) en chlooramphenicol waren toegevoegd om bacterie- en schimmelinfecties tegen te gaan.

Op drijfcultures sporuleert de schimmel vooral goed, indien pepton volgens Chapoteaut als voedingsmedium wordt gebruikt. De massaproductie van conidiosporen is op gekookte steriele rijst uitgevoerd. De vorming van blastosporen in schudcultures volgens de techniek van ADAMEK (1967) werd van tien stammen (vijf van de forma minor en vijf van de forma major) gecontroleerd. In het algemeen wordt na 96 uur een concentratie blastosporen bereikt, die ligt in de orde van grootte van  $10^8$  tot  $10^9$  per ml; één stam ontwikkelde er slechts een gering aantal.

De stammen werden met succes bewaard bij 4 °C door ze eerst te kweken op ei-geel, dat bij 80 °C gecoaguleerd was. Op deze manier kan men ze minstens 20 maanden goed houden. Het droogvriezen van suspensies van conidiën in taptemelk maakt het eveneens mogelijk de sporen 6 maanden kiemkrachtig te houden.

#### 11.1.4. Lijst van gastheerinsekten

Uit een zo volledig mogelijk literatuuronderzoek is gebleken, dat minstens 204 insectensoorten, vooral Coleopteren, onder natuurlijke omstandigheden kunnen lijden aan de door *M. anisopliae* veroorzaakte schimmelziekte. Het valt

daarbij op, dat het bij de Coleopteren voornamelijk om grondbewonende of onderaards levende insecten gaat.

#### 11.1.5. *De kieming en de ontwikkeling van de kiembuizen*

Het onderzoek werd uitgevoerd met de treksprinkhaan *Schistocerca gregaria* Forsk. De conidiosporen van *M. anisopliae* kiemen slechts bij contact met water. Met uitzondering van de intersegmentale zones, waar de plooiën van het integument geen directe waarneming mogelijk maken, schijnt de transpiratie van het insect de kieming van conidiosporen op vrije delen van het integument niet te beïnvloeden. Er is vastgesteld, dat de epicuticulaire lipiden van larven van het vijfde stadium de kieming van de conidiën positief kunnen beïnvloeden, in tegenstelling tot bijenwas. De samenstelling van de voedingsbodem, die voor de produktie van de conidiosporen wordt gebruikt, kan eveneens een belangrijke invloed hebben op de kieming van sporen, die op een extract van de epicuticulaire lipiden van sprinkhanen zijn gebracht; maar de verschillende stammen van *M. anisopliae* gedragen zich uiteenlopend. In vivo en in vitro vormt de schimmel na de kieming structuren, die analoog zijn met 'appressoria'. In vitro worden er echter slechts zelden penetratiebuizen onder de 'appressoria' gevormd. Soms zijn de appressoria niet nodig voor het ontstaan van penetratiebuizen.

#### 11.1.6. *Penetratie en infectie*

Uit histologische coupes is gebleken, dat de infectie van tweede stadium larven van de sprinkhanen door conidiën van een stam van *M. anisopliae*, die zelf van *S. gregaria* was geïsoleerd, ongeveer 90 uur na het toedienen van de sporen plaats vindt. De penetratie van de hyphen vindt plaats in de mondholte en wel voornamelijk in het proximale deel van de maxillaire palpen. Onder deze omstandigheden speelt de relatieve luchtvochtigheid, waarin de larven zich bevinden, geen enkele rol bij het infectieproces. Voor het penetreren van het integument is het daarentegen wel nodig, dat het dauwpunt wordt bereikt.

Bij larven van het derde stadium is vastgesteld, dat de schimmel niet bij voorkeur op bepaalde plaatsen penetreert, zoals bijvoorbeeld via de intersegmentale membranen. In principe kan de penetratie op elke willekeurige plaats van het integument plaats vinden. Waarnemingen duiden er op, dat het penetratieproces gepaard gaat met chemische en mechanische activiteit. Er kon geen phagocytose door haemocyten vastgesteld worden.

Er werden ook conidiosporen in het rectum ingespoten. Het bleek, dat infectie via deze weg ook mogelijk is; maar dit is van weinig betekenis, daar de infectie waarschijnlijk via de mond plaats heeft. De vorming van blastosporen geschiedt vermoedelijk daar, waar het mycelium, dat door het integument gedrongen is, in contact komt met de bewegende haemolympe.

#### 11.1.7. *Het laatste stadium van de ziekte*

De dood van het insect kan plaats vinden, zelfs als er relatief maar weinig schimmelmateriaal in het lichaam aanwezig is. Deze waarneming, evenals het

abnormale gedrag van het insect kort voor zijn dood, doet denken aan de werking van toxinen. Daarom is de giftigheid van kultuurfiltraten van tien stammen van *M. anisopliae* nagegaan op rupsen van *Galleria mellonella* L. en larven van *S. gregaria*. Daarbij zijn grote verschillen in activiteit tussen de stammen vastgesteld. Er kon niet aangetoond worden, dat er een correlatie bestaat tussen toxinvorming en hoge virulentie van een stam ten opzichte van larven van *S. gregaria*.

#### 11.1.8. Sporulatie

Wanneer sprinkhanenlarven in een ruimte geplaatst worden, waar de relatieve luchtvochtigheid zeer hoog is, ontstaan er soms bacterie-infecties, die een zekere sterfte kunnen veroorzaken. Onder deze ongunstige omstandigheden verandert dus de fysiologische toestand van het insect.

Bij het begin van een infectie door *M. anisopliae* constateert men eveneens een verzwakking van de waard en kan men, zelfs vóór de dood, tegelijkertijd blastosporen en bacteriën in de haemolympe waarnemen. Vervolgens ontstaat er na de dood van het insect een competitie tussen deze microorganismen. Onder overigens optimale omstandigheden voor de ontwikkeling van de schimmel kan de sporulatie geremd zijn, hoewel er in dit opzicht verschillen tussen de stammen bestaan. In vitro, op petrischalen met een Sabouraud voedingsbodem, is een vertraging vastgesteld van de schimmelgroei in de buurt van bacteriekolonies (vooral *Aeromonas* sp.). Als er heel weinig bacteriën zijn, vindt er pas sporulatie plaats op de insectenkadavers, als de relatieve luchtvochtigheid zeer hoog is; bij een relatieve luchtvochtigheid van b.v. 93 % vindt geen sporulatie plaats.

#### 11.1.9. Doseringsproeven

Uit doseringsproeven met hoeveelheden sporen, die de dood van sprinkhaanlarven van het tweede stadium kunnen veroorzaken, is gebleken, dat er aanzienlijke verschillen in werkzaamheid bestaan tussen de twaalf stammen, die bestudeerd zijn. Een schatting van de LD<sub>50</sub> is gedaan met een van *Polyphylla olivieri* CAST. geïsoleerde stam en er is vastgesteld, dat de helling van de rechte, die de relatie aangeeft tussen de logaritmie van de dosis en de mortaliteit in probits, zeer aanzienlijk is en overeenkomst vertoont met die van de insectendodende bacterie *Bacillus thuringiensis* BERL.

Gelijktijdig zijn soortgelijke proeven gedaan door het voedsel van sprinkhanen met sporensuspensies te bespuiten. Deze proeven zijn bij larven van het eerste, het tweede en het derde stadium verricht. Er zijn aanwijzingen dat de gevoeligheid van sprinkhanen voor de schimmelziekte slechts langzaam met de ouderdom afneemt, maar dat de incubatietijd van de ziekte langer wordt, als de larven ouder zijn. Het is eveneens mogelijk geslaagde orale doseringsproeven te doen met blastosporen uit schudcultures.

### 11.2. KONKLUSIES

In het verleden heeft het gebruik van preparaten op basis van *M. anisopliae*

bij de bestrijding van schadelijke insecten geen bevredigende resultaten gegeven, maar uit dit onderzoek blijkt, dat er gunstige perspectieven zijn voor het bestrijden van de woestijnsprinkhaan *S. gregaria* (FORSK.) en wel vooral van de larven van de eerste twee stadia.

Daar de besmetting van dit insect per os is vastgesteld, is het mogelijk de ontwikkeling van de schimmelziekte te veroorzaken zelfs bij zeer lage luchtvochtigheid, zoals die dikwijls voorkomt in de biotopen, waarin deze insecten leven. De kansen op het veroorzaken van een epizootie lijken echter beperkt, want voor de sporulatie van de schimmel, die noodzakelijk is voor de uitbreiding van de ziekte, moet de relatieve luchtvochtigheid zeer hoog zijn.

Men moet de omstandigheden bestuderen, waaronder *M. anisopliae* andere insecten infekteert, om de algemene mogelijkheden van orale infectie vast te stellen, en men moet nauwkeurig de sporendoses bepalen, die nodig zijn om in korte tijd een hoge mortaliteit te veroorzaken. Eerst dán zal men de gebruiksvoorwaarden voor dit biologische bestrijdingsmiddel nauwkeuriger kunnen beschrijven.

Er zal basisonderzoek moeten worden gedaan om de selectie van zeer virulente schimmelstammen mogelijk te maken, om die virulentie te behouden en hem eventueel door fysische en chemische methoden op te voeren. De specificiteit van de stammen ten opzichte van schadelijke en nuttige insecten en de eventuele werking op vertebraten vragen eveneens onze aandacht, hoewel deze laatste werking volgens de literatuur zeer onwaarschijnlijk lijkt.

Natuurlijk zullen de technische mogelijkheden en de produktiekosten uiteindelijk bepalend zijn voor het gebruik.

## 12. SUMMARY AND CONCLUSIONS

### 12.1. SUMMARY

#### 12.1.1. *Introduction*

The data from the literature concerning insect killing *Deuteromycetes* are discussed. Stress is laid on many fundamental problems and on gaps in the scientific observations.

#### 12.1.2. *Nomenclature*

It appears from a bibliographic survey that *Metarrhizium brunneum* PETCH, *Metarrhizium album* PETCH and *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN most probably represent a single species. The conidial lengths divide the fourteen isolated strains into two groups; these conform to the 'forma major' and the 'forma minor' of JOHNSTON (1915). Because of the supposed absence of original type material of *M. anisopliae* the author fixed a neotype and deposited it in the Centraal Bureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands).

#### 12.1.3. *Isolation, development and growth, storing*

Conidiospores of *M. anisopliae*, isolated from 14 species of insects, were cultivated on cherry-agar, on the medium according to MARTIN (1950) or on a special isolation medium (VEEN & FERRON, 1966). In the last medium, actidione (cycloheximide) and chloramphenicol is added in order to prevent infections by bacteria and fungi. The fungus sporulates excellently in surface cultures when the Chapoteaut peptone composition is used as nutrient medium. The mass production of conidiospores has been carried out on boiled sterile rice. The formation of blastospores has been tested in shake cultures according to the Adamek (1967) method; this has been done with five strains of forma major and five of forma minor. Generally a concentration of  $10^8$ – $10^9$  blastospores per ml. is obtained after 96 hours; one strain, however, sporulated only poorly.

The strains could be successfully stored at  $+4^\circ\text{C}$  for at least 20 months after culturing on egg-yolk coagulated at  $80^\circ\text{C}$ . Lyophilization of conidial suspensions in skimmed milk did not affect the germinating capacity of the spores for six months.

#### 12.1.4. *List of host insects*

Scrutiny of the literature revealed that at least 204 species of insects are susceptible to *M. anisopliae* under natural conditions. These are mostly *Coleoptera* of which the terricolous species predominate.

#### 12.1.5. *Germination and development of germtubes*

Conidiospores of *M. anisopliae* germinate only in contact with water. Inter-segmental folds of the host *Schistocerca gregaria* FORSK. prevented direct observations, but germination of the conidiospores on exposed parts of the cuticle



apparently are not affected by the transpiration of the insect. Epicuticular lipids of fifth stage larvae evoke conidial germination, in contrast to beeswax. The composition of the nutrient medium used for sporulation, may likewise exercise great influence on germination of spores when transferred to an extraction of epicuticular lipids of locusts; the various strains of *M. anisopliae* however behave differently. Both in vivo and in vitro the germinated fungus forms structures analogous to 'appressoria'. But in vitro only rarely penetration tubes originate beneath the 'appressoria'. Also the latter structures are not always essential to the development of penetration tubes.

#### 12.1.6. Penetration and infection

Histological sections show that the infection of second instar locust larvae by conidia of a race of *M. anisopliae* isolated from *S. gregaria* takes place after about 90 hours. The site of penetration of the hyphae is the mouth cavity, mainly the proximal part of the maxillary palps. The ambient relative humidity has no influence on this process.

Penetration of exposed integument, however, occurs only if a water film is present.

Experiments on third instar larvae have shown that the fungus has no preference for specific areas of the integument (as for instance the inter-segmental membranes) for penetration. Any area of the integument can be penetrated. It has been observed that both chemical and mechanical activities play a part in the penetration process.

Phagocytosis of the fungus by haemocytes was never observed.

Infection also takes place when conidiospores are injected in the rectum, but obviously this is of no importance under normal conditions when infection through the mouth prevails.

Probably, blastospores are formed in the places where the penetrating mycelium comes into contact with circulating haemolymph.

#### 12.1.7. The last stage of the disease

When the insect dies, the amount of fungus material in the body is often relatively insignificant. Shortly before death the insects often behave abnormally. These observations suggest an action of toxins. Therefore, the toxicity of culture filtrates of ten strains of *M. anisopliae* was assayed on caterpillars of *Galleria mellonella* L. and larvae of *S. gregaria*. Considerable differences in activity between the strains were found. However, we were unable to establish a correlation between the production of toxins of the different strains and the degree of virulence for *S. gregaria*.

#### 12.1.8. Sporulation

When locust larvae are kept in very high relative humidity, bacterial infections with a variable mortality are not uncommon. These unfavorable conditions obviously change the physiological condition of the insects. The early stages of

an infection by *M. anisopliae* are also characterized by a reduced vitality of the host. In many cases blastospores as well as bacteria are found side by side in the haemolymph, even before death. A competition between these microorganisms then occurs after death.

Under these conditions the sporulation of the fungus is inhibited, though to a different degree in different strains. This is also confirmed by the observation that bacterial colonies mainly (*Aeromonas sp.*) may locally suppress the growth of the fungus on a Sabouraud culture medium in Petri dishes. When few bacteria are present, sporulation on insect bodies only takes place in a high relative humidity. A relative humidity of 93% is already below the limit necessary for sporulation.

#### 12.1.9. Concentration effects

Experiments with spores in quantities sufficient to kill second instar hoppers have shown that considerable differences in activity exist within the twelve strains studied. The LD<sub>50</sub> of a strain isolated from *Polyphyla olivieri* CAST. has been determined. The inclination of the regression line representing the relation between the logarithm of the dose and the mortality in probits is fairly large and resembles the values obtained from the insect killing bacterium *Bacillus thuringiensis* BERL. In similar experiments the food of the hoppers was sprayed with a suspension of spores. These experiments have been performed on first, second and third instar larvae. It appears that the susceptibility of the hoppers to the fungus decreases only slightly during aging, but the incubation period becomes longer in older larvae. Dosage experiments may also be performed *per os* with blastospores from shake cultures.

### 12.2. CONCLUSIONS

In the past the use of insect killing materials, containing *M. anisopliae* gave only rather unsatisfactory results. However, from the present investigation it appears that the fungus possesses some features which may render it useful to control the desert locust especially larvae of the first and second instar.

As it has been established that infection in this species may occur via the mouth, it is possible to induce a fungal infection even in air of a very low humidity, as is often found in the habitat of this insect species. The chance of inducing an epizootic, however, seems to be limited because sporulation of the fungus, essential for a spreading of the disease, requests a very high relative humidity.

To determine the possibilities of oral infection in other insect species, it is necessary to study the conditions under which *M. anisopliae* becomes infectious. Also the doses of spores which are needed to cause high mortality within a short time should be determined. Only after this has been done it will be possible to derive the conditions for practical application of this biological control agent.

Of course technical factors and production costs will be decisive for its eventual use.

Fundamental research is needed in order to select highly virulent strains and

to maintain their virulence or to increase it by physical or chemical methods. It is also essential to investigate the specificity of the various strains to harmful and useful insects, as well as their possible effects on vertebrates, though the latter seems unlikely in view of the existing literature. Technical possibilities and the economics of mass-production will finally be decisive for the use.

### 13. BIBLIOGRAPHIE

- ADAMEK, L., 1965. Submerge cultivation of the fungus *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.). Folia microbiol. Praha 10: 255-257.
- AHLBERG, O., 1943. Jordflyharjningen i vastervikstrakten. Vaxtskyddsnotiser 5: 11-12.
- AINSWORTH, G. C. et SUSSMAN, A. S., 1966. The fungi, an advanced treatise. Academic Press, New York, London. Vol. II: 805 pp.
- AMARGIER, A. et VAGO, C., 1966. Coloration histologique pour étude de mycoses d'invertébrés. Mikroskopie 21: 271-275.
- ANONYME, 1914. Insect pests and fungoid diseases in Barbados, 1912-'13. Agric. News, Barbados 13, No. 315 et 316: 170-171 et 186.
- AOKI, K., 1957. Insect pathology. (En Japonais). Gihodo, Tokyo: 493 pp.
- ARX, J. A. VON, 1967. Pilzkunde. J. Cramer, Lehre: 356 pp.
- BAIRD, R. B., 1958. Use of fungous diseases in biological control of insects. Prov. 10th. int. Cong. Ent. 4: 689-692.
- BALFOUR-BROWNE, F. L., 1960. The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. Proc. R. ent. Soc. Lond. (A), 35, (416): 65-74.
- BARSS, H. P. and STEARNS, H. C., 1925. The green muscardine fungus (*Oospora destructor* (METSCH.) DELACROIX) on European earwig and other insects in Oregon. Phytopathology 15: 729.
- BASSI, A., 1958. Del Mal Del Segno. Phytopathological Classics No. 10. The Monumental Printing Company, Baltimore Maryland, U.S.A.: 49 pp.
- BILIOTTI, E., 1959. Observations epizootiologiques sur la processionnaire du pin. Revue Path. vég. Ent. agric. Fr. 27: 153.
- BOCZKOWSKA, M., 1935. Contribution à l'étude de l'immunité chez les chenilles de *Galleria mellonella* L. contre les champignons entomophytes. C.r. Séanc. Soc. Biol. 119: 39-40.
- BOURNE, B. A., 1921. Report of the assistant director of agriculture on the entomological and mycological work carried out during the season under review. Rep. Dept. Agric. Barbados, 1919-'20: 10-31.
- BUCHER, G. E., 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. J. Insect Path. 2: 172-195.
- BUCHER, G. E., 1964. The regulation and control of insects by fungi. Ann. ent. Soc. Queb. 9: 30-42.
- BÜNZLI, G. H. and BÜTTIKER, W. W., 1959. Fungus diseases of lamellicorn larvae in Southern Rhodesia. Bull. ent. Res. 50: 89-96.
- CAMUÑAS, M., 1919. Report of the commissioner of agriculture and labour. 19th Ann. Rept. Gov. P.R. Secy. War. App. IX: 685-707.
- CHARLES, V. K., 1941. A preliminary check list of the entomogenous fungi of North America. Insect Pest Surv. Bull. U.S. 21: 707-785.
- CHENG, W. Y. et CHEN, C. B., 1962. Preliminary studies on Green Muscardine fungus. Rep. Taiwan Sug. Exp. Stn. 29: 72-73.
- CHITTENDEN, F. H., 1919. The striped cucumber beetle and its control. Dep. Bull. U.S. Dep. Agric. (Farmers Bull. 1038): 19 pp.
- CLAUS, L., 1961. Untersuchungen über die Chitinasewirkung des insektentötenden Pilzes *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. Arch. Mikrobiol. 40: 17-46.
- CLEARE, L. D., 1930. The Tannia beetle, *Ligyris ebenus* de G. Ent. Bull. Dep. Agric. Br. Guiana 1: 11-23.
- CLEARE, L. D., 1933. The white grubs or 'Hardback Beetles' injurious to Sugar-cane in British Guiana. Ent. Bull. Dep. Agric. Br. Guiana 2: 28 pp.
- CLEARE, L. D. et SQUIRE, F. A., 1934. The coconut caterpillar, *Brassolis sophorae* L. (*Lep. Brassolidae*) in British Guiana. Agric. J. Br. Guiana 5: 166-199.
- CLERK, G. G. and MADELIN, M. F., 1965. The longevity of conidia of three insect-parasitizing *Hyphomycetes*. Trans. Br. mycol. Soc. 48 (2), 193-109.

- COLIZZA, C., 1929. Contributo alla conoscenza del balanino delle castagne (*Balaninus elephas*: *Insecta Coleoptera*). Boll. Lab. Zool. Portici 2: 244-263.
- CORBETT, G. H., 1937. Division of Entomology. Annual report for the year 1936. Gen. Ser. Dep. Agric. Straits Settl. 26: 29-48.
- DECKER, G. C., 1931. The biology of the Stalk Borer *Papaipema nebris* (Gn.) Res. Bull. Iowa Agric. Expt. Sta. 143: 289-351.
- DELACROIX, M. G., 1893. *Oospora destructor*, champignon produisant sur les insectes la muscardine verte. Bull. Soc. myol. Fr. 9: 260-264.
- DONAUHAUER, E., 1962. Beitrag zur Pathologie der Fichtengespinstblattwespe (*Cephaeleia abietis* L.). Verh. XI. Int. Kongr. Ent. (Wien 1960) 2: 864-866.
- DUMBLETON, L. J., 1945. Contribution to the ecology of *Oxycanus cervinata* WALK. N.Z.Jl. Sci. Technol. A 27: 114-128.
- DUTKY, S. R., 1957. Report on white grub control project in Chile. Agricultura t c., Santiago. 17: 92-105.
- EDWARDS, E. E. et EVANS, J. R., 1950. Observations on the biology of *Corymbites cupreus*. Ann. appl. Biol. 37(2): 253.
- EVLAKHOVA, A. A., 1958. L'influence de quelques facteurs chimiques et physiques sur la croissance et la virulence des champignons entomopathogènes. (En Russe). Biologicheskij Metod Bor'by s Vrediteljami sel' skochozjajstvennych kul'tur lesnych nasa denij. Izdanic Ministerst va sel'skogo Chozjajst va Moldavskoj S.S.R., ki inev: 16-17.
- EVLAKHOVA, A. A. et SCHEKHYRINA, T. A., 1963. Résistance anti-fongique de la cuticule d'*Erygaster integriceps* PUT. (En Russe). Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. 148: 977-978.
- FAWCETT, H. S., 1910. An important entomogenous fungus. Mycologia 2: 164-168.
- FOX, C. J. S. et R. P. JAKES. 1958. Note on the green-muscardine fungus, *Metarrhizium anisopliae* (METCH.) SOR., as a control for wireworms. Can. Ent. 90: 314.
- FRIEDERICH, K., 1919. Einiges  ber die Käfer des toten Holzes im Kiefernwald der Insel St. Marg rite (Südfrankreich). Ent. Bl. Biol. Syst. K fer. 15: 20-27.
- FRIEDERICH, K., 1920.  ber die Pleophagie des Insektenpilzes *Metarrhizium anisopliae* (METCH.) SOR. Zentbl. Bakt. Parasitkde 50, 2e Abt.: 335-355.
- FRIEDERICH, K., 1922. Verslag van den entomoloog over het tijdvak 1 Augustus 1921 t/m 31 December 1921. Med. Koffiebessenboekboek-Fonds 2: 21-26.
- FRIEDERICH, K., 1930. Die Grundfragen und Gesetzmässigkeiten der Land- und Forstwirtschaftlichen Zoologie insbesondere der Entomologie. II Bd. Wirtschaftliches Teil. P. Parey, Berlin: 463 pp.
- FRIEND, R. B., 1929. The asiatic beetle in Connecticut. Connecticut Agr. Expt. Stat. New Haven. 304: 584-684.
- GABRIEL, BERNARDO P., 1959. Fungus infection of insects via the alimentary tract. J. Insect Path. 1: 319-330.
- GETZIN, L. W., 1961. *Spicaria rileyi* (FARLOW) CHARLES, an Entomogenous Fungus of *Trichoplusia ni* (HÜBNER). J. Insect Path. 3: 2-10.
- GHOSH, C. C., 1937. The black beetle (*Alissonotum impressicollis* ARR.), a pest of sugarcane in Myitkyina District in Northern Burma. Indian J. agric. Sci. 7: 907-931.
- GLASER, R. W., 1926. The green muscardine disease in silkworms and its control. Ann. ent. Soc. Am. 19: 180-187.
- GOOT, O. VAN DER, 1915. Over eenige engerlingen soorten, die in riettuinen voorkomen. Med. Proefstn. Java-SuikInd. No. 10: 60 pp.
- GORHAM, R. P., 1923. Notes on *Agriotes mancus* SAY, at Dartmouth, N.S. Proc. Acadian ent. Soc. 1923: 69-72.
- GOUGH, L. H., 1910. The froghopper fungus and its practical application. Circ. Dep. Agric. Trin. 6: 1-6.
- GOUGH, L. H., 1910. Results of experiment with the 'Froghopper Fungus'. Proc. agric. Soc. Trin. 10, Soc. Paper 441: 463-465.
- GROENEWEGE, J., 1916. Bestrijding van insectenplagen van het suikerriet door schimmels en bacterien. Med. Proefstn. Java. SuikerInd. 18: 531-537.
- GROVER, R. K., 1964. The effect of amino acids on growth and sporulation of *Aspergillus*

- flavus* and their carry-over for subsequent spore germination. New Phytol. **63**: 12–20.
- GUAGLIUMI, P., 1953. El saltahoja de la caña de azúcar *Saccharosydne saccharivora* WESTW. y la fumagina en Venezuela. Bol. téc. Inst. nac. Agric. Venez. No. 7: 82 pp.
- HADLEY, C. H., 1939. Status of the Japanese beetle in the older area of infestation. Rep. ent. Soc. Ont. **69**: 18–21.
- HAMMOND, G. H., 1940. White grubs and their control in eastern Canada. Dom. Canada, Dep. Agr. Publ. 668 Farmers Bull. **86**: 18 pp.
- HESELTEINE, C. W., BRADLE, B. J. et BENJAMIN, C. R., 1960. Further investigations on the preservation of molds. Mycologia **52**: 762–774.
- HAYSLIP, N. C., 1943. Notes on biological studies of Mole Crickets at Plant City, Florida. Fla. Ent. **26**: 33–46.
- HETRICK, L. A., 1946. On the biology of the cowpea curculio in Virginia. J. Econ. Ent. **39**: 405.
- HOEHNEL, F. VON, 1909. Fragmente zur Mycologie No. 269. Sber. Akad. Wiss. Wien (I) **118**: 131–133.
- HOLT, W. R., 1961. *Metarrhizium anisopliae* (METCHNIKOFF) SOROKIN infecting larvae of the Black Turpentine Beetle. J. Insect. Path. **3**: 93.
- HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. Arch. Mikrobiol. **29**: 257–276.
- HUNTER-JONES, P., 1956. Instructions for rearing and breeding locusts in the laboratory. Anti-Locust Research Centre, London: 9 pp.
- HURPIN, B. et VAGO, C., 1958. Les maladies du hanneton commun (*Melolontha melolontha* L.) (*Col. Scarabaeidae*). Entomophaga. **3**: 292–294.
- HYSLOP, J. A., 1915. Wireworms attacking cereal and forage crops. Dep. Bull. U.S., Dep. Agric. **156** pp. 34.
- ILLINGWORTH, J. F. et JARVIS, E., 1918. Cane grub investigation. Qd. agric. J. **4**: 24–26.
- JACKSON, D. J., 1934. Parasites of weevils of the Genus *Sitona*. Scott. Nat. **207**: 75–79.
- JAGTAP, A. P., 1958. Studies in the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOR. Curr. Sci. **27** (3): 99–100.
- JAMES, H. C., 1946. The bionomics and control of *Tomaspis flavilatera* UR. the Demerara sugar cane froghopper. Proc. Br. W. Indies Sug. Techol. Sept./Oct. 1946: 41–42.
- JARVIS, E., 1916. Grub stage of the Cane-Beetle. Qd. agric. J. **6**: 35–36.
- JARVIS, E., 1924. Cane pest combat and control. Qd. agric. J. **21**: 436–437.
- JOHNSTON, J. R., 1915. The entomogenous fungi of Porto Rico. Gov. P.R. Bd. Comm. Agr. Bull. **10**: 26–28.
- JOHNSTON, J. R., 1918. Algunes hongos entomogenos de Cuba. Mem. Soc. cub. Hist. nat. 'Felipe Poey', No. 2 et 3: 61–82 pp.
- JONES, T. H., 1915. The sugar-cane weevil root-borer. Govt. P.R. Bd. Comm. Agric., Bull. **14**: 19 pp.
- KALASHNIKOV, K. JA., 1939. Essai de culture massive du champignon *Metarrhizium anisopliae* SOROK. (En Russe). Zash. ch. Rast. Vredit. **18**: 154–158.
- KALRA, A. N. et KULSHRESHTHA, J. P., 1961. Biology and control of *Lachnosterna consanguinea* (BLANCH.), a pest of sugarcane in Bihar (India). Bull. ent. Res. **52**: 577–587.
- KAMAT, M. N., PATEL, M. K. et DHANDE, G. W., 1952. Occurrence of the Green Muscardine Fungus on *Pyrilla* sp. in Bombay. Curr. Sci. **21** (11): 317.
- KARPINSKI, J. J., 1949. Annls Univ. Mariae Curie Sklodowska, Sect. E, **46** No. 1: 66.
- KATSUMATA, K., 1930. Results of the studies on *Scotinophara* (*Podops*) *lurida* BURM. (En Japonais). Ishikawa-ken Agric. Expt. Sta: 240 pp.
- KATSURA, S. K. et JOHNSON, A. G., 1937. The green muscardine fungus on the periodical cicada. Science N.Y. **86**: 128.
- KAVKAZSKAYA-TZEGE V. V. et MEDVEDEV, S. I., 1944. *Psallidium maxillosum* F. (En Russe). Nauch. Zap. sahk. Prom. **17**: 56–72.
- KAWAKAMI, K., 1960. On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. Bull. seric. Exp. Stn. Japan **16**, 2: 83–99.
- KAWAKAMI, K., 1965. Phagocytosis in muscardine-diseased larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Inv. Path. **7**: 203–208.

- KOBAYASHI, Y., 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daig. Section B. 5. No. 84: 53-260.
- KODAIRA, Y., 1961. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworms, *Bombyx mori*. J. Fac. Text. Seric. Shinshu Univ. 29: Ser. E No. 5: 1-68.
- KOIDSUMI, K., 1957. Antifungal action of cuticular lipids in insects. J. Insect Physiol. 1: 40-51.
- KRASSILSTCHIK, J., 1880. La production artificielle des parasites végétaux pour la destruction des insectes nuisibles. Rev. Gén. Agric. Vitic. 5 juin 1880: 44-47.
- LANJOUW, J. et al., 1961, International Code of Botanical Nomenclature. Utrecht.
- LATCH, G. C. M., 1965. *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN, strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. N. Z. Jl. agric. Res. 8: 384-396.
- LEEFMANS, S., 1916. Over *Helopeltis* in theetuin. Meded. Proefstn. Thee, Buitenz. 46: 21 pp.
- LEIBY, R. W., 1920. The larger corn stalk-borer in North Carolina, *Diatraea zeacolletta* DYAR. Bull. N. Carol. Dep. Agric. 41 13: 85 pp.
- LE MOULT, L., 1893. Destruction du Hanneton et de sa larve par l'*Isaria densa*. Bull. Sci. France, Belgique 25: 494-511.
- LEPAGE, H. S. et MONTE, O., 1942. As ciqarrinhas do capim 'kikuo'. Biológico 8: 255-259.
- LEPESME, P., 1938. Recherches sur une Aspergilliose des Acridiens. Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. N. 29: 372-384.
- LEWIN, C. J., 1936. Agriculture in the territory. Rep. Dep. Agric. Nth. Rhod. 1935: 3-7.
- LIHNELL, D., 1944. Grönmykos Försäkrad av *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. II Fysiologiska undersökningar över grönmykosens svamp. Stat. Växtskyddsanst. Stockholm Meddel. 43: 59-90.
- MACLEOD, D. M., 1954. Natural and cultural variation in entomogenous fungi imperfecti. Ann. N.Y. Acad. Sci. 60: 58-70.
- MAJCHROWICZ, I., 1962. Badania grzybami towarzyszącymi abumieraniu Stanki ziemniaczanej. (*Leptinotarsa decemlineata* SAY) w glebie Zesz. probl. Postp. Nauk. roln 35: 255-259.
- MARCHIONATTO, J. B., 1942. Nota sobre la 'Muscardina Verde' (*Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOR.). Revta chil. Hist. nat. 1942-1943: 12-14.
- MARTIN, J. P., 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci. 69: 215-232.
- MARTEORELL, L. F., 1945. A survey of the forest insects of Puerto Rico. J. Agric. Univ. P.R. 29: 432-436.
- MASERA, E., 1957. *Metarrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN parassita del baco da seta. Ann. Sper. Agr. 11: 281-295.
- MC.COLLOCK, J. W., 1919. *Eleodes opaca* SAY, an important enemy of wheat in the Great Plains area. J. econ. Ent. 2: 183-194.
- MC.COY, E. E. et CARVER, C. W., 1941. A method for obtaining spores of the fungus *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. in quantity. Jl. N.Y. ent. Soc. 49: 205-210.
- METSCHNIKOFF, E., 1879. Maladies des hannetons du blé. (En Russe) Zapiski Imperatorskogo Obščestva Sel'skogo Hozjajstva Južnoj Rossii God sorok devjatij. 1879. Janvar': 21-50.
- METSCHNIKOFF, E., 1880. Zur Lehre über Insektenkrankheiten. Zool. Anz. 3: 44-47.
- PASTEUR, L., dans: MOREAU, F., 1952. Les Champignons. Tome I Paul Lechevalier Editeur. Paris: 393. pp.
- MORIMOTO, T., 1954. Studies on the pathogenic fungi of Insects. VII. On the exterminatory effects upon black rice bugs of *Oospora destructor* in the fields. Res. Rep. Kōchi Univ. 3: no. 6: 1-6.
- MORIMOTO, T., 1959. Studies on muscardines attacking injurious insects of cultivated plants and on some antagonistic bacteria to muscardines. Mem. Fac. Agric. Kōchi Univ. 7: 1-61.
- MOUTIA, A. L., 1941. The search for parasites of white grubs (*Melolonthids*) in Zanzibar, Algeria, Morocco and France. Bull. ent. Res. 31: 196.
- MUIR, F., 1921. The sugar-cane leafhopper and its parasites in Hawaii. Hawaii. Plrs' Rec. 25: 108-123.
- MÜLLER-KÖGLER, E., 1959. Zur Isolierung und Kultur insektenpathogener *Entomophthoraceen*. Entomophaga 4: 261-274.

- MÜLLER-KÖGLER, E., 1960. Niedrige Keimprocente der Sporen insekten-pathogener Pilze: eine mögliche Fehlerquelle bei ihrer Anwendung. Z. Pflkrankh. 67: 663-668.
- MÜLLER-KÖGLER, E., 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Paul Parey, Berlin, Hamburg: 444 pp.
- MÜLLER-KÖGLER, E., HUGER, A. et FERRON, P., 1965. Zur färberischen Darstellung pilzlichen Befalls in Insekten. Naturwissenschaften 52: 543.
- MYERS, J. G., 1932. Biological observations on some Neotropical parasitic *Hymenoptera*. Trans R. ent. Soc. Lond. 80: 121-136.
- NATTRASS, R. M., 1932. Preliminary notes on some entomogenous fungi in Egypt. Bull. Minist. Agric. Egypt. 120: 6.
- NOTINI, G., 1938. Undersökningar rörande på rödklöver levande spetsvivlar (*Apion* Herst). 2. Ekologiska undersökningar. Meddn St. VäxtskAnst. 22: 44 pp.
- NOTINI, G. et MATHLEIN, R., 1944. Grönmykos förorsakad av *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. I Grönmykosen som biologiskt insekt bekämpningsmedel. Meddn St. VäxtskAnst. 43: Stockholm.
- Ogloblin, A. et JAUCH, C., 1943. Reacciones pathológicas de los Acridios atacados por *Aspergillus parasiticus*. Revta argent Agron. 10 (3): 256-267.
- OTT, R., 1960. Untersuchungen über die Gewächsschildläuse *Pseudococcus maritimus*, *Aspidiotus hederae* und *Diaspis bromeliae*. Diss. Giessen 1960: 119 pp.
- PEMBERTON, C. E., 1938. Entomology. Rep. Comm. Exp. Sta. Hawaii Sug. Pl. Ass. 1938: 19-29.
- PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Trans. Br. mycol. Soc. 16: 67-71.
- PETCH, T., 1934. Notes on entomogenous fungi. Trans. Br. mycol. Soc. 19: 189.
- PETTIT, R. H., 1895. Studies in artificial cultures of entomogenous fungi. Cornell Univ. Agric. Exper. Sta. Bulletin 97: 337-378.
- PHILLIPS, W. J. et FOX, H., 1924. The rough-headed corn stalk-beetle. Dep. Bull. U.S. Dep. Agric. No. 1267: 31.
- PICARD, F., 1913. La teigne des pommes de terre (*Phthorimaea operculella*) (Lep.). Annls Serv. Epiphyt. 1: 106-176.
- PILASH, M. V., 1938. Perméabilité de la chitine des insectes aux champignons entomophytes. (En Russe). Lenin Akad. Agric. URSS No. 8: 73-75.
- PLANK, H. K., 1948. Life history, habits, and control of the coconut Rhinoceros beetle in Puerto Rico. Bull. fed. (agric.) Exp. Sta. P.R. 45: 35 pp.
- PONTOCORVO, G., 1949. The origin of virulent strains as recombinants from non-virulent strains, and the kinetics of epidemics. 4th. Int. Congr. Microbiol., Copenhagen 1947, Rep. Proc.: 376.
- POSPELOV, V. P., 1938. Methods, of infecting insects with entomogenous fungi. Summ. Sci. Res. Work Inst. Plant Prot. 1936, 3: 64-67.
- RADHA, K., NIRULA, K. K. et MENON, K. P. V., 1956. The green muscardine disease of *Oryctes rhinoceros* L. II. The causal organism. Indian Cocon. J. 9: 83-89.
- RAPER, K. B. et ALEXANDER, D. F., 1945. Preservation of molds by the lyophil process. Mycologia 37: 499-525.
- ROBERTS, D. W., 1964. Production, extraction and assay of toxic substances from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae* (METCHNIKOFF) SOROKIN. Thesis. Berkeley.
- ROBERTS, D. W., 1966. Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae* I + II. J. Inv. Path. 8: 212-221 + 222-227.
- ROBINSON, R. K., 1966. Studies on penetration of insect integument by fungi. Pest Art. News Summ. Sect. B. 12: 131-142.
- ROCKWOOD, L. P., 1950. Entomogenous fungi of the genus *Metarrhizium* on wireworms in the Pacific Northwest. Ann. ent. Soc. Amer. 43: 495-498.
- ROEPKE, W., 1915. Sprinkhanenplagen. Teysmannia 26: 765-769.
- RORER, J. B., 1910. The green muscardine of froghoppers. Proc. agric. Soc. Trin. Soc. Paper 442: 1-16.
- RORER, J. B., 1913. The use of the green muscardine in the control of some sugar-cane pests. Phytopathology 3: 88-92.
- ROZSZYPAL, J., 1941. Příspěvek k poznání škůdce máku nosatce *Stenocarus fuliginosus* MRSH. Ent. Listy 4: 34-60.



- SATTERTHWAIT, A. F. et SWAIN, R. B., 1946. The sunflower moth and some of its natural enemies. *J. econ. Ent.* **39**: 575-580.
- SCHAEFFENBERG, B., 1959. Zur Biologie und Ökologie des insektentötenden Pilzes *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOR. *Z. angew. Ent.* **44**: 262-271.
- SCHAEFFENBERG, B., 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarrhizium*. *J. Insect Path.* **6**: 8-20.
- SCHEIN, R. D., 1964. Comments on the moisture requirements of fungus germination. *Phytopathology*, **54**: 1427.
- SIEMASKO, W., 1937. Etudes sur les champignons entomopathogènes en Pologne. (En Polonais). *Arch. Nauk biol.* **6**: 1-83.
- SOROKIN, N., 1883. Les parasites des plantes, de l'Homme et des animaux. (En Russe). *Rastitel'nye parazity čeloveka i životnyh*. Band II: 268-290.
- SPEARE, A. T., 1912. Fungi parasitic upon insects injurious to sugar-cane. *Bull. Hawaii Sug. Ass., Ent. Ser.* **12**: 43-53.
- STEINHAUS, E. A., 1951. Report on diagnoses of diseased insects 1944-1950. *Hilgardia* **20**: 629-678.
- STEINHAUS, E. A. et MARSH, G. A., 1962. Report of diagnoses of diseased insects 1951-1961. *Hilgardia* **33**: 490 pp.
- STEVENSON, E. A., 1918. The Green Muscardine fungus in Porto Rico. *J. Dep. Agric. P. R.* **2**: 19-32.
- SUZUKI, A., KUYAMA, S., KODAIRA, Y. et TAMURA, S., 1966. Structural elucidation of De-struxin A. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **30**: 517-518.
- SWINGLE, H. S. et SEAL, J. L., 1931. Some fungous and bacterial diseases of Pecan Weevil larvae. *J. econ. Ent.* **24**: 917.
- SWINGLE, H. S. et SEAL, J. L., 1934. Fungous and Bacterial diseases of the Pecan Weevil. *Agr. Exp. Stat. Alab. Pol. Inst. Auburn*. 44th Ann. Rep.: 29.
- TCHANG YUNG-TAI, 1929. Recherches sur l'histogenèse et l'histophysiologie de l'épithélium de l'intestin moyen chez un Lépidoptère (*Galleria mellonella* L.). *Bull. biol. Belg.* **XII**.
- TROUPIN, G., 1949. La terminologie des types en botanique systématique. *Bull. Royale Bot. Belgique* **82**: 57-65.
- TRYON, H., 1914. Cane grub and muscardine fungus at Cairns. *Qd. agric. J.* **2**: (No. 6): 402-405.
- UBRIZSY, G. et VÖRÖS, J., 1962. Observations et essais sur des champignons entomophages en Hongrie. *Entomophaga. Coll. Int. Path. des Ins. et Lutte Micr.*: 125-128.
- VAGO, C., 1958. Virulence cryptogamique simultanée vis-à-vis d'un végétal et d'un insecte. *C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* **247**: 1651-1653.
- VAN DINE, D. L., 1913. Report of the entomologist. *Expt. Sta. Sugar Prod. Assoc. P. R. Bull.* No. 5: 25-46.
- VEEN, K. H., 1966. Oral infection of second-instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarrhizium anisopliae*. *J. Inv. Path.* **8**: 254-256.
- VEEN, K. H. et FERRON, P., 1966. A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarrhizium anisopliae*. *J. Inv. Path.* **8**: 268-269.
- VEEN, K. H., 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarrhizium anisopliae*. *J. Inv. Path.* **9**: 276-278.
- VOUK, V., et KLAS, Z., 1931. Conditions influencing the growth of the insecticidal fungus *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOR. *Int. Corn. Borer Inv.* **4**: 24-45.
- VUILLEMIN, P., 1904. Les *Isaria* du genre *Penicillium*. *Bull. Soc. mycol. Fr.* **20**: 214-221.
- WADE, J. S. et BÖVING, A. G., 1921. Biology of *Embaphion muricatum*. *J. agric. Res.* **22**: 323-334.
- WALLENGREN, H., et JOHANSSON, R., 1929. On the infection of *Pyrausta nubilalis* Hb. by *Metarrhizium anisopliae* (METSCH.) SOR. *Int. Corn. Borer Inv.* **2**: 131-145.
- WILLIAMS, C. B., 1921. The froghopper-blight of sugar-cane in Trinidad. *Mem. Dep. Agric. Trin. Rep.* 1 Jan. 1921: 82-85.
- ZADOKS, J. C. et GROENEWEGER, L. J. M., 1967. On light-sensitivity in germinating uredospores of wheat brown rust. *Neth. J. Pl. Path.* **73**: 83-103.